

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006189

International filing date: 30 March 2005 (30.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-100649
Filing date: 30 March 2004 (30.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

14.04.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 3月30日

出願番号
Application Number: 特願2004-100649

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

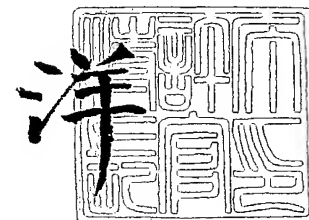
JP 2004-100649

出願人
Applicant(s): 株式会社レノメディクス研究所

2005年 4月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 2185RM
【提出日】 平成16年 3月30日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61P 31/00
C12N 5/00
C12N 15/00

【発明者】
【住所又は居所】 札幌市中央区旭ヶ丘 5 丁目 6 - 2 5
【氏名】 藤永 ▼恵▲

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市松代 5 丁目 1 4 番地 5 5 5 棟 2 号
【氏名】 品川 森一

【発明者】
【住所又は居所】 札幌市中央区北 3 条西 3 0 丁目 2 - 1 - 9 0 1
【氏名】 新津 洋司郎

【発明者】
【住所又は居所】 札幌市中央区宮ヶ丘 2 - 1 - 3 0 - 6 0 2
【氏名】 濱田 洋文

【発明者】
【住所又は居所】 札幌市北区太平 5 条 2 丁目 2 - 2 7
【氏名】 堀内 基広

【発明者】
【住所又は居所】 札幌市中央区南 1 条西 2 4 丁目 1 - 1 3 - 1 4 0 1
【氏名】 本望 修

【発明者】
【住所又は居所】 東京都府中市美好町 2 - 8 - 2 0 - 3 0 7
【氏名】 梅谷 淳

【特許出願人】
【識別番号】 502455393
【氏名又は名称】 株式会社レノメディクス研究所

【代理人】
【識別番号】 100102842
【弁理士】
【氏名又は名称】 葛和 清司

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 058997
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

間葉系細胞を有効成分として含む、プリオン病の治療のための剤。

【請求項 2】

間葉系細胞が、異常プリオン増殖阻害活性を有する、請求項1に記載の剤。

【請求項 3】

間葉系細胞が、異常プリオン増殖阻害活性を有する抗プリオン抗体の遺伝子が導入されたものである、請求項1または2に記載の剤。

【請求項 4】

抗体遺伝子が、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子とからなり、抗体重鎖遺伝子が、

(1 a) 配列番号 3 または 5 の配列を含む核酸、

(1 b) 遺伝子コードの縮重により前記 (1 a) の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(1 c) 前記 (1 a) または (1 b) の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(1 d) 前記 (1 a) ~ (1 c) のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択され、抗体軽鎖遺伝子が、

(2 a) 配列番号 4 または 6 の配列を含む核酸、

(2 b) 遺伝子コードの縮重により前記 (2 a) の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(2 c) 前記 (2 a) または (2 b) の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(2 d) 前記 (2 a) ~ (2 c) のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択され、前記抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子を発現させて得た抗体が、異常プリオン増殖阻害活性を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の剤。

【請求項 5】

静脈内投与用である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の剤。

【請求項 6】

間葉系細胞が骨髓細胞、臍帯血細胞および末梢血細胞からなる群から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の剤。

【請求項 7】

抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子とからなる抗プリオン抗体遺伝子であって、抗体重鎖遺伝子が、

(1 a) 配列番号 3 または 5 の配列を含む核酸、

(1 b) 遺伝子コードの縮重により前記 (1 a) の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(1 c) 前記 (1 a) または (1 b) の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(1 d) 前記 (1 a) ~ (1 c) のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択され、抗体軽鎖遺伝子が、

(2 a) 配列番号 4 または 6 の配列を含む核酸、

(2 b) 遺伝子コードの縮重により前記 (2 a) の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(2 c) 前記 (2 a) または (2 b) の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコー

ドするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、
(2d) 前記(2a)～(2c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリン
ジেন্টな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機
能を有するポリペプチドをコードする核酸、
からなる群から選択され、前記抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子を発現させて得た抗
体が、異常プリオン増殖阻害活性を有する、前記抗プリオン抗体遺伝子。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の抗プリオン抗体遺伝子を含むベクター。

【請求項 9】

RGD 配列を含むアデノウイルスベクターである、請求項 8 に記載のベクター。

【請求項 10】

細胞に、異常プリオン増殖阻害活性を付与する遺伝子を導入することを含む、異常プリ
オン増殖阻害活性を有する細胞の作製方法。

【請求項 11】

異常プリオン増殖阻害活性を付与する遺伝子が、抗プリオン抗体遺伝子である、請求項
10 に記載の方法。

【請求項 12】

細胞に、請求項 8 または 9 に記載のベクターを介して、請求項 7 に記載の遺伝子を導入
することを含む、異常プリオン増殖阻害活性を有する細胞の作製方法。

【請求項 13】

細胞が、間葉系細胞である、請求項 10～12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

請求項 10～13 のいずれかの方法で作製された、異常プリオン増殖阻害活性を有する
細胞。

【請求項 15】

請求項 13 に記載の方法を含む、プリオン病の治療のための剤の製造方法。

【請求項 16】

間葉系細胞の、プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤の製造への使用。

【請求項 17】

間葉系細胞を含む、プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】プリオン病治療剤およびその製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、間葉系細胞、特に異常プリオン増殖阻害活性を有する間葉系細胞を有効成分とするプリオン病治療剤、およびその製造方法に関する。本発明はまた、異常プリオン増殖阻害活性を有する遺伝子が導入された細胞、特に間葉系細胞、およびその製造方法に関する。本発明はさらに、間葉系細胞を用いたプリオン病の病変部位に物質を送達するための剤にも関する。

【背景技術】

【0002】

現在、異常プリオンタンパク質 (PrP^S) の蓄積によって引き起こされるプリオン病に注目が集まっている。プリオン病は様々な動物種で見られ、ヒトのクールー、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病 (GSS)、ヒツジおよびヤギのスクレイピー、ミンク伝染性脳症、シカ慢性消耗性疾患、ウシ海綿状脳症 (BSE)、ネコ海綿状脳症などが知られている。いずれも発症までの潜伏期間が長く、神経細胞の脱落を伴う脳の萎縮が見られ、種々の神経症状を呈するという共通の特徴を持つ。

【0003】

プリオンタンパク質は正常な細胞の表面に普通に存在するタンパク質である。正常なプリオンタンパク質 (PrP^C) と PrP^S は、同一のアミノ酸配列を持つがその立体構造が異なっており、その結果両者の生物学的、物理学的特性は全く異なったものとなっている。現在のところ、 PrP^C が PrP^S との接触により PrP^S 変化し、その結果 PrP^S が増殖し、神経細胞を変性させることでプリオン病が発症するという仮説が有力であるが、正確なメカニズムは未だ不明である。プリオン病は、 PrP^S の摂取または投与により種間バリアを超えて伝染する特性を有しており、中でも BSE のヒトへの感染が近年大きな問題となっている。

【0004】

BSE は、 PrP^S を含むウシの特定部位の摂取などにより人体へ感染し、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) を発症する。vCJD は精神症状と高次機能障害 (記憶力低下、計算力低下、失見当識、行動異常、性格変化、無関心、不安、不眠、失認、幻覚など) で初発し、数ヶ月で痴呆、妄想、失行が急速に進行、さらに起立、歩行が不能になり、3~7ヶ月で無動性無言状態に陥り、1~2年で全身衰弱、呼吸麻痺、肺炎などで死亡する病気である。BSE 感染による vCJD は、2002年5月までに英国で122名が報告されており、英国における発症推移予測によると近未来には数千名から数万名の患者が発症すると推定されているため、日本においても将来的には少なくとも年間数万名の患者が予想される。

【0005】

かかる状況を受けて、プリオン病の治療に関して様々な研究がなされているが、未だ有効な治療法が確立されていないのが現状である。

初期の研究においては、既知の化合物の中からプリオン病に有効なものを検索する試みがなされ、このうちアンホテリシン B (Xi YG et al. 1992. Nature 356(6370):598-601)、コンゴレッド (Caughey B et al. 1992. J Neurochem 59(2):768-71)、アントラサイクリン (Tagliavini F et al. 1997. Science 276(5315):1119-22)、キナクリン、チロロン、クロロキン、E-64 d などのシステインプロテアーゼ阻害剤 (Doh-Ura K et al. 2000. J Virol 74(10):4894-7)、プロマジン、クロルプロマジン、アセプロマジンなどのフェノチアジン誘導体 (Korth C et al. 2001. Proc Natl Acad Sci U S A 98(17):9836-41)、ポルフィリンやフタロシアニンなどのテトラピロール類 (Caughey WS et al. 1998. Proc Natl Acad Sci U S A 95(21):12117-22)、ペントサンポリサルフェート、リアクティブ・グリーンおよびリアクティブ・レッドなどのリアクティブ・ダイ、キニーネ

、8-ハイドロキシキノリン-2-カルボクسالデヒド8-キノリルヒドラゾン、2-ピリジンカルボクسالデヒド2-キノリルヒドラゾンおよび2, 2'-バイキノリンなどのキニーネ類（特開2003-40778号公報）などが、培養細胞や動物実験の結果から有効である可能性が示唆されていたが、その有用性は依然として確立されていない。

【0006】

特許文献1には、GAPDHの酸性アイソフォームを減少させ、および／または塩基性アイソフォームを増加させることで、PrP^c、ひいてはPrP^S^cの発現を抑制することができることに着目し、GAPDHのアンチセンス核酸またはデプレニルの投与によりプリオン病の予防および治療が可能であることが記載されている。しかし、かかる方法では、PrP^S^cの発生は減少するかもしれないが、同時にPrP^cの発現も抑制され、PrP^cの本来の機能の達成に支障が出る恐れがある。

【0007】

非特許文献1には、PrP^cの変異体がドミナントネガティブ効果によりPrP^S^cの形成をin vitroで阻害したことが記載されており、プリオン病治療への有効性が示唆されているが、in vivoでの有効性はまだ確認されていない。

また、抗プリオン抗体がin vitroでPrP^S^cの形成を阻害し、in vivoにおいてもスクレイピーのモデルマウスにおいてPrP^S^c低減効果ならびに延命効果を有することが最近報告され（非特許文献2）、プリオン病の抗体療法が注目を集めたが、その後、抗プリオン抗体の投与により海馬および小脳のニューロンにアポトーシスが生じたことが報告されるなど（非特許文献3）、その有用性は依然不透明な状態にある。

【0008】

以上の通り、精力的な研究が世界的に行われているにもかかわらず、現在のところプリオン病に有効な治療法は未だ存在せず、新たな治療剤や治療法の登場が強く求められていた。

【特許文献1】特開2004-81034

【特許文献2】国際公開第03/038074号パンフレット

【非特許文献1】Kaneko K et al. 1997. Proc Natl Acad Sci U S A. 94(19):10069-74

【非特許文献2】White AR et al. 2003. Nature 422(6927):80-3

【非特許文献3】Solforosi L et al. 2004. Science 303(5663):1514-6

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、プリオン病の治療に有効で、安全性の高い剤の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行ったところ、マウスの骨髄から採取した骨髄幹細胞をプリオン病モデルマウスに投与することにより、局所投与のみならず、静脈内投与によっても顕著な治療効果が得られることを見出した。さらに、該骨髄幹細胞に、PrP^S^c増殖阻害活性を有する抗プリオン抗体の遺伝子を導入し、同様の実験を行ったところ、上記治療効果が劇的に改善することを見出し、本発明を完成させた。

【0011】

即ち、本発明は、間葉系細胞を有効成分として含む、プリオン病の治療のための剤に関する。

また本発明は、間葉系細胞が、異常プリオン増殖阻害活性を有する、上記剤に関する。

さらに本発明は、間葉系細胞が、異常プリオン増殖阻害活性を有する抗プリオン抗体の遺伝子が導入されたものである、上記剤に関する。

【0012】

本発明はまた、抗体遺伝子が、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子とからなり、抗体重鎖

遺伝子が、

(1 a) 配列番号 3 または 5 の配列を含む核酸、

(1 b) 遺伝子コードの縮重により前記 (1 a) の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(1 c) 前記 (1 a) または (1 b) の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(1 d) 前記 (1 a) ~ (1 c) のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択され、抗体軽鎖遺伝子が、

(2 a) 配列番号 4 または 6 の配列を含む核酸、

(2 b) 遺伝子コードの縮重により前記 (2 a) の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(2 c) 前記 (2 a) または (2 b) の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(2 d) 前記 (2 a) ~ (2 c) のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択され、前記抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子を発現させて得た抗体が、異常プリオン増殖阻害活性を有する、上記剤に関する。

【0013】

本発明はさらに、静脈内投与用である上記剤に関する。

さらにまた、本発明は、間葉系細胞が骨髄細胞、臍帯血細胞および末梢血細胞からなる群から選択される上記剤に関する。

また本発明は、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子とからなる抗プリオン抗体遺伝子であって、抗体重鎖遺伝子が、

(1 a) 配列番号 3 または 5 のいずれかの配列を含む核酸、

(1 b) 遺伝子コードの縮重により前記 (1 a) の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(1 c) 前記 (1 a) または (1 b) の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(1 d) 前記 (1 a) ~ (1 c) のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択され、抗体軽鎖遺伝子が、

(2 a) 配列番号 4 または 6 のいずれかの配列を含む核酸、

(2 b) 遺伝子コードの縮重により前記 (2 a) の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(2 c) 前記 (2 a) または (2 b) の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(2 d) 前記 (2 a) ~ (2 c) のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択され、前記抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子を発現させて得た抗体が、異常プリオン増殖阻害活性を有する、前記抗プリオン抗体遺伝子に関する。

【0014】

さらに本発明は、上記の抗プリオン抗体遺伝子を含むベクターに関する。

本発明はさらにまた、RGD配列を含むアデノウイルスベクターである、上記ベクターに関する。

本発明はまた、細胞に、異常プリオン増殖阻害活性を付与する遺伝子を導入することを

含む、異常プリオン増殖阻害活性を有する細胞の作製方法に関する。

本発明はさらに、異常プリオン増殖阻害活性を付与する遺伝子が、抗プリオン抗体遺伝子である上記方法に関する。

さらにまた、本発明は、細胞に、上記のベクターを介して、上記の遺伝子を導入することを含む、異常プリオン増殖阻害活性を有する細胞の作製方法に関する。

また、本発明は、細胞が間葉系細胞である上記方法に関する。

【0015】

さらに、本発明は上記の方法で作製された、異常プリオン増殖阻害活性を有する細胞に関する。

本発明はまた、上記の方法を含む、プリオン病の治療のための剤の製造方法に関する。

本発明はさらに、間葉系細胞の、プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤の製造への使用に関する。

さらにまた、本発明は、間葉系細胞を含む、プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤に関する。

【発明の効果】

【0016】

本発明は、プリオン病の治療に優れた効果を奏するものであるが、かかる効果は、間葉系細胞が、 PrP^{Sc} の増殖を伴う病変部位に遊走・定着し、脱落した神経細胞に代わって機能不全に陥った神経組織を再生することによって達成されたものと考えられる。間葉系細胞がプリオン病の病変部位へ遊走し得るという事実は、これまでのところ、プリオン病の病変部位へ治療剤を送達できる有効な方法が全く知られていないことから驚くべき発見であり、当業者の予測をはるかに超えるものである。また、上記細胞に抗プリオン抗体遺伝子を導入することにより治療効果が劇的に向上することは、病変部位において分泌された抗プリオン抗体による新たな PrP^{Sc} の発生の抑制や、間葉系細胞の神経再生能などの複合的な作用によるものと考えられる。

プリオン病の進行を遅延させるだけでなく、同疾患によって失われた神経組織を再建し、その機能の回復を達成し得る本発明の剤は、これまでに全く例のないものである。

【0017】

本発明の治療剤の投与により、これまで不可能と考えられてきたプリオン病の治療が可能となるので、医学および獣医学領域において多大な貢献が期待できる。しかも、本発明の剤に用いる間葉系細胞は、骨髓、臍帯血または末梢血から作製することができるので、ES細胞を用いる場合のように倫理的問題が生じることもなく、また、自己由来の細胞から容易に作製することができるので、投与の際も拒絶反応などの好ましくない生体反応を惹起するおそれが少ない。さらに、従来の治療剤が主として PrP^{Sc} 増殖抑制作用を有するのみで、症状の進行を遅延させることができるにすぎないところ、本願発明の剤は、かかる作用に加え、患部へ遊走した間葉系細胞がそこに定着し、自らが神経細胞へ分化して変性した神経組織を再建するので、症状の進行を遅らせるのみならず、症状を改善するという、従来の治療剤では到底不可能であった優れた効果を奏することができる。また、本発明の送達剤は、プリオン病の病変部位に治療剤や標識物質などの所望の物質を送達することができるので、プリオン病の治療のみならず、その研究や診断に大いに寄与するものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本明細書中に別記のない限り、本発明に関して用いられる科学的および技術的用語は、当業者に通常理解されている意味を有するものとする。一般的に、本明細書中に記載された細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝子およびタンパク質および核酸化学ならびにハイブリダイゼーションに関して用いられる用語、およびその技術は、当該技術分野においてよく知られ、通常用いられているものとする。一般的に、別記のない限り、本発明の方法および技術は、当該技術分野においてよく知られた慣用の方法に従って、本明細書中で引用され、議論されている種々の一般的な、およびより専門的な参考

文献に記載されたとおりに行われる。かかる文献としては、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) および Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Press (2001); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992, および2000の補遺); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology - 4th Ed., Wiley & Sons (1999); Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); および Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)などが挙げられる。

【0019】

酵素反応および精製技術は、製造者の仕様書に従い、当該技術分野において通常なされているとおりに、または本明細書に記載のとおりに行うものとする。本明細書中に記載された分析化学、合成有機化学ならびに医薬品化学および薬化学に関して用いられる用語、ならびにその実験手順および技術は、当該技術分野においてよく知られ、通常用いられているものである。標準的な技術を、化学合成、化学分析、薬剤の製造、製剤および送達、ならびに対象の処置に用いるものとする。

なお、本発明における用語「対象」は、任意の生物個体を意味し、好ましくは動物、さらに好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトの個体である。本発明において、対象は健常であっても、何らかの疾患に罹患していてもよいものとするが、プリオン病の処置が企図される場合には、該疾患に罹患している対象または実験的に罹患させた対象、例えばマウス、ラット、スナネズミ、モルモットなどの齧歯類、ネコ、ピューマ、トラなどのネコ科動物、シカ、オオシカなどのシカ科動物、ミンク、ヒツジ、ヤギ、ウシ、サル、ヒトなどであることが好ましい。

【0020】

本発明においては、間葉系細胞を有効成分として含む、プリオン病治療のための剤が提供される。

本発明において、プリオン病とは、PrP^{Sc}を病原とするあらゆる疾患を含む。かかる疾患としては、例えば、クールー、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー病(GSS)、ヒツジおよびヤギのスクレイピー、ミンク伝染性脳症、シカ慢性消耗性疾患、ウシ海綿状脳症(BSE)、ネコ海綿状脳症などが含まれるが、これらに限られない。上記疾患は、先天性または後天性(伝染性のものを含む)であってもよく、例えば、BSE感染牛の摂食により発症すると考えられる変異型CJD(vCJD)や、ヒト乾燥硬膜などの使用による医原性CJDも含まれる。また、本発明におけるプリオン病は、現在まだ知られていない、PrP^{Sc}を病原とする任意の疾患を包含する。

【0021】

本発明における間葉系細胞とは、好ましくは骨髄細胞(骨髄細胞の単画球分画成分)、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞、間葉系幹細胞、またはこれら細胞に由来する細胞等を指す。また、本発明の間葉系細胞には、例えば、間葉系に関連する細胞、中胚葉幹細胞等が含まれる。なお、本発明において「間葉系細胞」として記述された細胞が、将来的に間葉系細胞以外の細胞として分類される場合であっても、本発明においては当該細胞を好適に利用することができる。

【0022】

骨髄中には幹細胞として、造血幹細胞と「間葉系幹細胞(MSC: Mesenchymal Stem Cell)」とがある。ここで「幹細胞」とは、一般に、生体を構成する細胞の生理的な増殖・分化などの過程において、自己増殖能と、特定の機能を持つ細胞に分化する能力とをあわせ有する未分化細胞のことである。造血幹細胞は、赤血球、白血球、あるいは血小板に分化する幹細胞である。間葉系幹細胞は、神経幹細胞を経て神経に分化する場合、神経幹細胞を経ないで直接的に神経に分化する場合、ストローマ細胞を経て神経に分化する場合

、内臓に分化する場合、血管系に分化する場合、または骨、軟骨、脂肪、あるいは筋肉に分化する場合があることが知られている。

【0023】

本発明では、主として間葉系幹細胞を利用するが、造血幹細胞や、体内の他の幹細胞（前駆細胞）を利用できる可能性があることにも言及しておく。間葉系幹細胞は骨髓やから採取された骨髓細胞から分離して得られる。なお、間葉系幹細胞を分離していない骨髓細胞も、有効性は若干劣るものの、間葉系幹細胞と同じように治療に用いることができる。

また、間葉系幹細胞のような細胞が、末梢血中から調製できる可能性も考えられる。実際、本発明者らは、末梢血のなかに混じっている細胞から培養してきた細胞を、神経幹細胞や神経系細胞（神経細胞、グリア細胞）のマーカーを出現する細胞へ誘導することに成功した。一方、本発明者らは既に、骨髓液または臍帯血から分離される単核細胞分画から調製した中胚葉幹細胞（間葉系幹細胞）、またはES細胞を、基礎的培養液で培養すると、該中胚葉幹細胞（間葉系幹細胞）または該ES細胞が神経幹細胞、神経細胞またはグリア細胞へ分化誘導することを見出している（特許文献2参照）。したがって、末梢血中の細胞を培養することにより、間葉系幹細胞と同等の機能を有する細胞を調製し、本発明に利用することも可能である。

【0024】

本発明において、中胚葉幹細胞とは、発生学的に中胚葉と分類される組織を構成している細胞を指し、血液細胞も含まれる。また、中胚葉幹細胞とは、自己と同じ能力を持った細胞をコピー（分裂、増殖）することができ、中胚葉の組織を構成している全ての細胞へ分化し得る能力を持った細胞を指す。中胚葉幹細胞は、例えば、SH2（+）、SH3（+）、SH4（+）、CD29（+）、CD44（+）、CD11b（-）、CD14（-）、CD34（-）、CD45（-）の特徴を有する細胞であるが、これらマーカーに特に制限されない。また所謂、間葉系に関連する幹細胞も、本発明の中胚葉幹細胞に含まれる。

【0025】

上記の間葉系に関連する細胞とは、間葉系幹細胞、間葉系細胞、間葉系細胞の前駆細胞、間葉系細胞から由来する細胞のことを意味する。

間葉系幹細胞とは、例えば、骨髓、末梢血、皮膚、毛根、筋組織、子宮内膜、血液、臍帯血、更には、種々の組織の初期培養物から得ることができる幹細胞のことである。また末梢血中の細胞を培養して得ることができる間葉系幹細胞と同等の機能を有する細胞も本発明の間葉系幹細胞に含まれる。

本発明において好ましい間葉系細胞としては、骨髓細胞、骨髓幹細胞を好適に示すことができる。その他、本発明の細胞の好ましい例として、臍帯血細胞、末梢血細胞、胎児肝細胞等を挙げることができる。

【0026】

本発明における骨髓細胞、臍帯血細胞、末梢血細胞、胎児肝細胞の好ましい態様としては、骨髓、臍帯血、末梢血、または胎児肝より分離して得た細胞の一分画であって、神経系細胞へ分化し得る細胞を含む細胞分画を挙げることができる。

他の一つの態様において、該細胞分画は、SH2（+）、SH3（+）、SH4（+）、CD29（+）、CD44（+）、CD14（-）、CD34（-）、CD45（-）の特徴を有する中胚葉幹細胞を含む細胞分画である。

本発明において、上記以外の細胞分画の例としては、Lin（-）、Sca-1（+）、CD10（+）、CD11D（+）、CD44（+）、CD45（+）、CD71（+）、CD90（+）、CD105（+）、CDW123（+）、CD127（+）、CD164（+）、フィブロネクチン（+）、ALPH（+）、コラーゲンゼー1（+）の特徴を有する間質細胞を含む細胞分画、あるいはAC133（+）の特徴を有する細胞を含む細胞分画を挙げることができる。

また、本発明においては、上記細胞分画に含まれる細胞は、神経系細胞へ分化し得る細胞であることが好ましい。

【0027】

本発明における細胞分画には、骨髓細胞より分離して得た単核細胞分画であって、神経系細胞へ分化し得ることを特徴とする細胞が含まれる。その他の態様として、例えば臍帯血細胞、末梢血細胞、または胎児肝細胞より分離して得た単核細胞分画であって、神経系細胞へ分化し得ることを特徴とする細胞が含まれる。その他の態様として、例えば活性物質や薬剤を用いて末梢血中に放出させられた骨髓中の間葉系幹細胞であって、神経系細胞へ分化し得ることを特徴とする細胞が含まれる。本発明の細胞分画に含まれる細胞の神経系細胞への分化は、いわゆる血液系細胞の神経系細胞への形質転換により生じるのか、それとも骨髓細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞などの中に存在する神経細胞に分化できる未熟な細胞の分化によるものであるかは明確ではないが、神経系細胞へ分化する細胞は、主として、幹細胞、即ち、自己増殖能と多分化能を有する細胞であると考えられる。また、神経系細胞へ分化する細胞は、ある程度他の胚葉へ分化している幹細胞であり得る。

【0028】

本発明の細胞分画に含まれる細胞は、栄養因子によって増殖することは要せず（栄養因子によって増殖することは可能である）、神経自己移植技術の開発という点では簡便で、かつ現実性の高いものであり、その医療産業上の有益性は多大なものであるといえる。本発明における骨髓細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞（細胞分画）は、一般的には、脊椎動物に由来する。好ましくは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ミンク、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、シカ、ブタ、イヌ、サル、ヒトなど）由来であるが、特に制限されない。

【0029】

本発明における細胞分画は、例えば、脊椎動物から採取した骨髓細胞、臍帯血細胞を、2000回転で比重に応じた分離に十分な時間、溶液中にて密度勾配遠心を行い、遠心後、比重1.07 g/mlから1.1 g/mlの範囲に含まれる一定の比重の細胞分画を回収することにより調製することができる。ここで「比重に応じた分離に十分な時間」とは、密度勾配遠心のための溶液内で、細胞がその比重に応じた位置を占めるのに十分な時間を意味する。通常、10～30分間程度である。回収する細胞分画の比重は、好ましくは1.07 g/mlから1.08 g/mlの範囲（例えば、1.077 g/ml）である。密度勾配遠心のための溶液としては、Ficoll液やPercoll液を用いることができるがこれらに制限されない。また、脊椎動物から採取した臍帯血細胞を上記と同様に調製し、細胞分画として利用することもできる。

【0030】

具体例を示せば、まず、脊椎動物より採取した骨髓液（5～10 μ l）を溶液（1 L-15を2 ml + Ficollを3 ml）に混合し、遠心（2000回転で15分間）し、単核細胞分画（約1 ml）を抽出する。この単核細胞分画を細胞の洗浄のために培養溶液（NPBM 2 ml）に混合して、再度、遠心（2000回転で15分間）する。次いで、上澄みを除去した後、沈降した細胞を回収する。本発明の細胞分画の採取源としては、大腿骨以外にも、胸骨や、骨盤を形成している腸骨から採取することもできる。これらの骨以外でも大きい骨であれば採取可能である。また、骨髓バンクに保存してある骨髓液や臍帯血から採取することも可能である。臍帯血細胞を利用する場合には、骨髓バンクに保存してある臍帯血から採取することも可能である。

【0031】

本発明の細胞分画の他の態様は、骨髓細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞より単離・精製して得た単核細胞分画であって、神経系細胞へ分化し得る中胚葉幹細胞（間葉系幹細胞）を含む細胞分画である。中胚葉幹細胞を含む細胞分画は、例えば、骨髓細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞から遠心分離して得た上記の細胞分画の中から、上記SH2等の細胞表面マーカーを有する細胞を選択することにより得ることができる。

【0032】

また、神経系細胞へ分化し得る中胚葉幹細胞（間葉系幹細胞）を含む細胞分画は、脊椎

動物から採取した骨髓細胞、臍帯血細胞を、900 gで比重に応じた分離に十分な時間、溶液中にて密度勾配遠心を行い、遠心後、比重1.07 g/mlから1.1 g/mlの範囲に含まれる一定の比重の細胞分画を回収することにより調製することができる。ここで「比重に応じた分離に十分な時間」とは、密度勾配遠心のための溶液内で、細胞がその比重に応じた位置を占めるのに十分な時間を意味する。通常、10～30分間程度である。回収する細胞分画の比重は、細胞の由来する動物の種類（例えば、ヒト、ラット、マウス）により変動し得る。密度勾配遠心のための溶液としては、Ficol液やPercoll液を用いることができるが、これらに制限されない。

【0033】

具体例を示せば、まず、脊椎動物から採取した骨髓液（25 ml）または臍帯血を同量のPBS溶液に混合し、遠心（900 gで10分間）し、沈降細胞をPBSに混合して回収（細胞密度は 4×10^7 細胞/ml程度）することにより、血液成分を除去する。その後、そのうち5 mlをPercoll液（1.073 g/ml）と混合し、遠心（900 gで30分間）し、単核細胞分画を抽出する。細胞の洗浄のために、抽出した単核細胞分画を培養溶液（DMEM、10% FBS、1% anti-biotic-antimycotic solution）に混合し、遠心（2000回転で15分間）する。次いで、遠心後の上澄みを除去し、沈降した細胞を回収し、培養する（37℃、5% CO₂ in air）。

【0034】

本発明の細胞分画の他の態様は、骨髓細胞、臍帯血細胞より分離して得た単核細胞分画であって、神経系細胞へ分化しうる間質細胞を含む細胞分画である。間質細胞は、例えば、Lin（-）、Sca-1（+）、CD10（+）、CD11D（+）、CD44（+）、CD45（+）、CD71（+）、CD90（+）、CD105（+）、CDW123（+）、CD127（+）、CD164（+）、フィブロネクチン（+）、ALPH（+）、コラーゲナーゼ-1（+）の特徴を有する細胞である。間質細胞を含む細胞分画は、例えば、骨髓細胞、臍帯血細胞から遠心分離して得た上記の細胞分画の中から、上記Lin等の細胞表面マーカーを有する細胞を選択することにより得ることができる。

【0035】

また、脊椎動物から採取した骨髓細胞、臍帯血細胞を、800 gで比重に応じた分離に十分な時間、溶液中にて密度勾配遠心を行い、遠心後、比重1.07 g/mlから1.1 g/mlの範囲に含まれる一定の比重の細胞分画を回収することにより調製することができる。ここで「比重に応じた分離に十分な時間」とは、密度勾配遠心のための溶液内で、細胞がその比重に応じた位置を占めるのに十分な時間を意味する。通常、10～30分間程度である。回収する細胞分画の比重は、好ましくは1.07 g/mlから1.08 g/mlの範囲（例えば、1.077 g/ml）である。密度勾配遠心のための溶液としては、Ficol液やPercoll液を用いることができるがこれらに制限されない。

【0036】

具体例を示せば、まず、脊椎動物から採取した骨髓液または臍帯血を同量の溶液（PBS + 2% BSA + 0.6% クエン酸ナトリウム + 1% ペニシリンーストレプトマイシン）溶液に混合し、そのうちの5 mlをFicol + Paque液（1.077 g/ml）と混合し、遠心（800 gで20分間）し、単核細胞分画を抽出する。この単核細胞分画を細胞の洗浄のために培養溶液（ α MEM、12.5% FBS、12.5% ウマ血清、0.2% α -イノシトール、20 mM 葉酸、0.1 mM 2-メルカプトエタノール、2 mM L-グルタミン、1 μ M ヒドロコルチゾン、1% anti-biotic-antimycotic solution）に混合し、遠心（2000回転、15分間）する。次いで、遠心後の上澄みを除去した後、沈降した細胞を回収し、培養する（37℃、5% CO₂ in air）。

【0037】

本発明の細胞分画の他の態様は、骨髓細胞、臍帯血細胞、末梢血細胞、または胎児肝細胞より分離して得た単核細胞分画であって、神経系細胞へ分化し得るAC133（+）の特徴を有する細胞を含む細胞分画である。この細胞分画は、例えば、骨髓細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞から遠心分離して得た上記の細胞分画の中から、上記AC133

(+) の細胞表面マーカーを有する細胞を選択することにより得ることができる。

また、その他の態様として、脊椎動物から採取した胎児肝細胞を、2000回転で比重に応じた分離に十分な時間、溶液中にて密度勾配遠心を行い、遠心後、比重1.07 g/ml から1.1 g/ml の範囲に含まれる細胞分画を回収し、この細胞分画から、AC133 (+) の特徴を有する細胞を回収することにより調製することができる。ここで「比重に応じた分離に十分な時間」とは、密度勾配遠心のための溶液内で、細胞がその比重に応じた位置を占めるのに十分な時間を意味する。通常、10～30分間程度である。密度勾配遠心のための溶液としては、Ficoll 液やPercoll 液を用いることができるがこれらに制限されない。

【0038】

具体例を示せば、まず、脊椎動物から採取した肝臓組織をL-15溶液内で洗浄し、酵素処理 (L-15+0.01% Dnase I、0.25% トリプシン、0.1% コラゲナーゼを含む溶液中で、37度で30分間) し、ピペッティングにより単一細胞にする。この単一細胞となった胎児肝細胞を遠心分離する。これにより得られた細胞を洗浄し、洗浄後の細胞からAC133抗体を利用してAC133 (+) 細胞を回収する。これにより胎児肝細胞から神経系細胞へ分化しうる細胞を調製することができる。抗体を利用したAC133 (+) 細胞の回収は、マグネットビーズを利用して、または、セルソーター (FACS など) を利用して行うことができる。

【0039】

これら中胚葉幹細胞 (間葉系幹細胞)、間質細胞、あるいはAC133陽性細胞を含む細胞分画は、脊髄脱髄領域への移植後に、効率よく再有髄化する。特に、上記中胚葉幹細胞 (間葉系幹細胞) を含む細胞分画は、プリオン病モデルへ投与しても、良好に生着し、神経系細胞あるいはグリア細胞に分化することができる。

また、上記細胞分画に含まれる神経系細胞に分化し得る細胞として、例えば、上記細胞分画に含まれる神経幹細胞、中胚葉幹細胞 (間葉系幹細胞)、および間質細胞、AC133陽性細胞が含まれるが、神経系細胞に分化し得る限り、これらに制限されない。

また、本発明におけるプリオン病の治療剤の有効成分としては、例えば、骨髓細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞だけでなく、上記細胞分画も含まれる。

【0040】

本発明の剤に用いられる間葉系細胞、例えば、骨髓細胞、臍帯血細胞または末梢血細胞は、そのまま投与に用いることも可能であるが、治療効率を向上させるために、該細胞に種々の改変を加えることができる。したがって、本発明の別の側面では、かかる改変を受けた間葉系細胞を有効成分として含むプリオン病治療のための剤が提供される。

上記改変の例としては、該細胞へのPrP^S 増殖阻害活性を付与するような遺伝子の導入が挙げられる。ここで、PrP^S 増殖阻害活性とは、例えば、生体内におけるPrP^S の存在量の絶対的増加および/またはPrP^C の存在量に対する相対的増加を抑制し、阻止し、あるいはPrP^S の存在量の絶対的および/または相対的減少をもたらすことができる能力を意味する。かかる効果は、直接的、または、間接的に達成されてもよいが、生体に好ましくない影響を与えないものが好ましい。また、上記活性は抑制の程度の大きいものがより好ましく、PrP^S の存在量を減少させることができるものが最も好ましい。

【0041】

PrP^S 増殖阻害活性を付与し得る遺伝子としては、例えばPrP^S 増殖阻害活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子などが挙げられる。かかるポリペプチドは、抗プリオン抗体、プロトカドヘリン43およびOB-カドヘリン-1などのカドヘリン (特表2000-512131)、プラスミノゲン、プラスミノゲン断片およびその誘導体 (特表2004-501626) などを包含するが、これらに限定されるわけではない。

【0042】

本発明において、抗プリオン抗体とは、PrP^C および/またはPrP^S に結合可能な抗体を意味する。本明細書においては、特に別記のない限り、用語「抗体」は、インタ

クトな免疫グロブリン、または、その抗原結合部分を包含する。抗原結合部分としては、例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、d A b および相補性決定領域断片などが挙げられるが、P r P^c および/または P r P^s に結合可能なこれら以外の部分をも包含する。本発明に用いられる抗プリオン抗体は P r P^s 増殖阻害活性を有するものが好ましく、例えば、非特許文献 2、非特許文献 3、Enari M et al. 2001. Proc Natl Acad Sci U S A 98(16):9295-9、Peretz D et al. 2001. Nature 412(6848):739-43、Gilch S et al. 2003. J Biol Chem 278(20):18524-31などに記載されたものや、ハイブリドーマクローン 72-5 (寄託番号: FERM P-18516) および 44B1 (寄託番号: FERM P-18515) により産生されるものなどが挙げられる。また、かかる活性を有することがまだ知られていないが、実際には当該活性を有する抗プリオン抗体も本発明に好適に用いることができる。このような抗体は、スクレイピー感染細胞株などを用いる評価系によってスクリーニングすることができる (上記 Enari M et al.、Gilch S et al.などを参照)。

【0043】

さらに、抗プリオン抗体またはその断片を新たに作製し、P r P^s 増殖阻害活性についてスクリーニングすることで、本発明に有用な抗体を得ることも可能である。プリオンタンパク質は抗原性が極めて弱く、通常の免疫法では抗体を作製することが難しかったが、Buelerらによるプリオン遺伝子ノックアウトマウス (P r n p^{-/-}マウス) の開発 (Bueler H et al. 1992. Nature 356(6370):577-82) により、同マウスをプリオンタンパク質またはそのエпитープを含む抗原で定法に従い免疫することによって、抗プリオン抗体を作製することが可能となった。もっとも、本発明においては、P r n p^{-/-}マウスを用いる以外の方法によって作製された抗プリオン抗体が除外されるわけではない。抗原としては、例えば、P r P^s 感染組織のホモジネート、その精製物またはこれらの変性産物、プリオンタンパク質の一部のアミノ酸配列を含む合成ペプチド、組換えプリオンタンパク質などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0044】

抗プリオン抗体遺伝子のクローニングには、当該技術分野で周知の任意の技法を用いることができる。例えば、抗プリオン抗体産生細胞の RNA をもとに cDNA ライブラリを構築し、抗体に特異的なプライマーを用いて、求める抗体遺伝子を得ることができる。より具体的には、例えば、抗体の定常領域に特異的なプライマーを作製し、RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法などの公知の手法により、未知の可変領域の核酸配列を含むポリヌクレオチドを得ることができるが、本発明の抗プリオン抗体遺伝子にかかる方法で得られるものに限られない。得られたポリヌクレオチドは、所定の制限酵素で消化し、任意の周知のベクターにクローニングすることができる。

【0045】

本発明で用いることができる抗プリオン抗体遺伝子としては、例えば、抗体重鎖遺伝子と抗体軽鎖遺伝子とからなるものであって、抗体重鎖遺伝子が、

(1 a) 配列番号 3 または 5 の配列を含む核酸、

(1 b) 遺伝子コードの縮重により前記 (1 a) の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(1 c) 前記 (1 a) または (1 b) の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(1 d) 前記 (1 a) ~ (1 c) のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、

からなる群から選択され、抗体軽鎖遺伝子が、

(2 a) 配列番号 4 または 6 の配列を含む核酸、

(2 b) 遺伝子コードの縮重により前記 (2 a) の核酸と同一のポリペプチドをコードする核酸、

(2 c) 前記 (2 a) または (2 b) の核酸の配列に変異を有するが、なお該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、および、

(2d) 前記(2a)～(2c)のいずれかの核酸の相補鎖、またはその断片にストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、該核酸がコードするポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードする核酸、
からなる群から選択され、前記抗体重鎖遺伝子および抗体軽鎖遺伝子を発現させて得た抗体が、 PrP^{Sc} 増殖阻害活性を有するものが挙げられる。

これらの遺伝子のうち、発現させた場合に PrP^{Sc} 増殖阻害活性のより高いものが本発明においては好ましい。

【0046】

本明細書で用いる「ストリンジェントな条件」という用語は、当該技術分野において周知のパラメータである。核酸のハイブリダイゼーションのパラメータは、標準的なプロトコル集、例えば Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Press (2001) や、Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992) などに記載されている。

【0047】

具体的には、本明細書において用いるストリンジェントな条件は、65℃での、 $3.5 \times \text{SSC}$ 、フィコール 0.02%、ポリビニルピロリドン 0.02%、ウシ血清アルブミン 0.02%、 NaH_2PO_4 25mM (pH 7)、SDS 0.05%、EDTA 2mM からなるハイブリダイゼーションバッファーによるハイブリダイゼーションを指す。なお、上記のうち、SSC は 0.15M 塩化ナトリウム / 0.15M クエン酸ナトリウム、pH 7 であり、SDS はドデシル硫酸ナトリウムであり、また EDTA はエチレンジアミン四酢酸である。ハイブリダイゼーション後、DNA が移された膜は、 $2 \times \text{SSC}$ にて室温において、次いで $0.1 \sim 0.5 \times \text{SSC} / 0.1 \times \text{SDS}$ にて 68℃ までの温度において洗浄される。あるいは、ストリンジェントなハイブリダイゼーションは、ExpressHyb (登録商標) 緩衝液 (Clontech 社製) などの市販のハイブリダイゼーションバッファーを用いて、製造者によって記載されたハイブリダイゼーションおよび洗浄条件で行ってもよい。

【0048】

同程度のストリンジェンシーを生じる結果となる使用可能な他の条件、試薬等が存在するが、当業者はかかる条件に通じていると思われるため、これらについては、本明細書中に特段記載はしていない。しかしながら、本発明の変異体をコードしている核酸の相同体または対立遺伝子の明確な同定ができるよう、条件を操作することが可能である。

【0049】

PrP^{Sc} 増殖阻害活性を付与する遺伝子の間葉系細胞への導入に際しては、公知の種々の方法を用いることができる。例えば、該遺伝子をウイルスベクターに組み込み、該ベクターを間葉系細胞に感染させて導入する方法や、燐酸カルシウムトランスフェクション法 (Berman et al. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7176)、DEAE-デキストラントランスフェクション、プロトプラスト融合 (Deans et al. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1292)、電気穿孔 (エレクトロポレーション)、リボソーム融合、ポリブレンによるトランスフェクションおよび細胞膜のレーザー微穿孔による遺伝子の直接的な送達を包含する、周知の多数の技法によって、上記遺伝子を間葉系細胞に導入することができる。当業者はまた、前記遺伝子を細胞のゲノムに組み込み、当該遺伝子の発現を可能にするように細胞内に適切に導入することのできる上記以外のいかなる技術をも本発明に用いることができる。

【0050】

本明細書に用いる場合、「ベクター」は、異なる遺伝的環境間の移送のため、または宿主細胞における発現のために、消化またはライゲーションによって所望の核酸分子を導入できる任意の核酸を意味する。ベクターは典型的には DNA から構成されるが、RNA ベクターを用いることもできる。ベクターは、プラスミド、ファージミド、およびウイルスゲノムを含むがこれに限定されるものではない。クローニングベクターは、自律的に、あるいはゲノムへの組み込みの後に、宿主細胞中で複製することができるものであり、それは

さらに1または2以上のエンドヌクレアーゼ制限部位によって特徴づけられ、当該ベクターはその部位で決定可能な様式で切断され、そこに所望の核酸配列を連結することができ、これにより、新規な組換えベクターは宿主中で目的とする核酸分子を複製することが可能となる。プラスミドの場合には、宿主細菌内のプラスミドのコピー数が増えることにより、所望の核酸分子が何度も複製されてよく、あるいは細胞分裂によって宿主が再生される前に宿主あたり1回だけ複製されてもよい。ファージの場合には、複製は溶菌相の間は積極的に、あるいは溶原相の間は受動的に起きてよい。

【0051】

発現ベクターは、その中に所望の核酸配列が消化およびライゲーションにより挿入され、それが調節配列に対して作動可能に連結されて、転写物として発現されようとするものである。

本発明に用いられる遺伝子は、1または2以上の遺伝子から構成されていてもよく、2以上の遺伝子から構成されている場合には、これらの遺伝子を単一の発現ベクターに挿入することも、また、2以上のベクターに分けて挿入することもできる。

発現ベクターはさらに、当該ベクターによって形質転換またはトランスフェクトされたか、またはされていない細胞を同定するのに適当な1または2以上のマーカー配列を含んでもよい。マーカーは、例えば抗生物質または他の化合物に対する抵抗性または感受性のどちらかを亢進または低下させるタンパク質をコードしている遺伝子、その活性が当該技術分野における標準的な分析法によって検出可能な酵素（例えば、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、またはアルカリ性ホスファターゼ）をコードする遺伝子、および形質転換またはトランスフェクトされた細胞、宿主、コロニー、またはプラークの表現型に視覚的に影響する遺伝子を含む。好ましい発現ベクターは自律的な複製と、それに対してベクターが作動可能に連結されているDNAセグメントに存在する構造遺伝子産物の発現が可能なベクターである。

【0052】

本明細書においては、コード配列および調節配列は、当該コード配列の発現または転写が、当該調節配列の影響または支配下にあるように位置される様式において連結されている場合、「作動可能に」連結されているということとする。もし当該コード配列を機能的なタンパク質に翻訳することが望まれる場合には、2つのDNA配列は、もし5'調節配列におけるプロモーターによる誘導の結果、当該コード配列の転写が生じ、またもし当該2つのDNA配列の間の連結の性質が、(1)フレームシフト突然変異を誘導する結果とならず、(2)当該コード配列の転写を指示するための当該プロモーターの能力を妨害せず、あるいは(3)タンパク質に翻訳されるべき対応するRNA転写物の能力を妨害しない場合には、「作動可能に」連結されているといわれる。したがってプロモーター領域は、もし当該プロモーター領域が、結果として得られる転写物が所望のタンパク質またはポリペプチドに翻訳されるように、そのDNA配列を転写できれば、作動可能にコード配列に連結されていることになる。

【0053】

本発明において有用なベクターは、所望により、例えば哺乳動物、微生物、ウイルス、または昆虫遺伝子から誘導される適当な転写または翻訳調節配列と機能的に結合した本発明の変異体をコードしている核酸分子を含む。かかる調節配列は、遺伝子発現において調節的役割を有する配列、例えば転写プロモーターまたはエンハンサー、転写を調節するためのオペレーター配列、メッセンジャーRNA内部のリボゾーム結合部位をコードしている配列、ならびに、転写、翻訳開始または転写終了を調節する適切な配列を包含する。

【0054】

遺伝子発現に必要な調節配列の詳細な性質は、生物種または細胞種によって異なってもよいが、一般的には、少なくとも、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列などの、各々転写および翻訳の開始に関与する5'非転写、および5'非翻訳配列を含み得る。特に、かかる5'非転写調節配列は、作動可能に連結された遺伝子の転写調節のためのプロモーター配列を含む、プロモーター領域を含み得る。調節配列はまた、エンハン

サー配列か、または所望の上流のアクチベーター配列を含んでもよい。本発明のベクターは、任意に 5' リーダーまたはシグナル配列を含んでもよい。適切なベクターの選択および設計は、当業者の能力および自由裁量の範囲内にある。

【0055】

特に有用な調節配列は、種々の哺乳動物、ウイルス、微生物、および昆虫遺伝子由来のプロモーター領域を包含する。このプロモーター領域は、その遺伝子の転写の開始を指令し、そして補助分子リガンド遺伝子を含む DNA の全ての転写をもたらす。有用なプロモーター領域は、CAG プロモーター、レトロウイルスの dLTR プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) エンハンサー／プロモーター領域、RSV の LTR プロモーター、lac プロモーター、およびアデノウイルスから分離したプロモーターを包含するが、真核生物、原核生物、ウイルス、または微生物細胞での遺伝子発現に有用な、当業者に公知の他の任意のプロモーターを用いることもできる。

【0056】

真核生物細胞内で、遺伝子およびタンパクを発現するのにとりわけ有用なその他のプロモーターは、哺乳動物細胞プロモーター配列およびエンハンサー配列、例えばポリオーマウイルス、アデノウイルス、SV40 ウイルス、およびヒトサイトメガロウイルスから誘導されるものを包含する。典型的には SV40 などのウイルスのウイルス複製起点に隣接して見出される、ウイルスの初期および後期プロモーターが、特に有用である。特定の有用なプロモーターの選択は、その細胞株、および、特定の細胞株内部で本発明の変異体を発現させるために使用する核酸構築物についての、他の様々なパラメータに依存する。さらに、本発明において有用な充分高いレベルで、標的細胞に遺伝子を発現させることが知られている任意のプロモーターを選択することができる。

【0057】

上記発現ベクターは、所望により、発現ベクターから生成される mRNA の、タンパク質への効率的な翻訳を可能にするリボゾーム結合部位、PrP^S 増殖阻害活性を付与する遺伝子に機能的に結合していてもよい種々のシグナルペプチドをコードしている核酸配列を包含する、種々のさらなる調節配列を含むことができる。シグナルペプチドは、もし存在するならば、翻訳されたポリペプチドの細胞外分泌の改善を可能にする前駆体アミノ酸として発現される。

したがって、本発明の核酸構築物は、プロモーター配列またはプロモーターおよびエンハンサー配列のいずれかと作動可能に結合し、さらに mRNA の終止およびポリアダニル化を指令するポリアダニル化配列に機能的に結合した、本発明の核酸分子の様々な型を包含する。本発明の核酸構築物は、所望の細胞内部でのその構築物の効率的な複製および発現を可能にするその他の遺伝子配列を含み得る。かかる配列は、ウイルス遺伝子等から誘導されるイントロンを包含し得る。

【0058】

本発明において、間葉系細胞への遺伝子導入に好適に用いることができるウイルスベクターとしては、例えば、特開 2002-330789 号公報に記載の改変アデノウイルスが挙げられる。該アデノウイルスは、野生型アデノウイルスに対する主要なレセプターである CAR (コクサッキーアデノウイルスレセプター) との結合能を実質的に有しないファイバータンパク質に、特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク質、および／または、実質的に CAR との結合能を有しないファイバータンパク質を、特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有するように改変した改変ファイバータンパク質を有するものであるが、本発明においては、実質的に CAR との結合能を有しないファイバータンパク質に RGD (Arg-Gly-Asp) モチーフを含む分子を接続した改変ファイバータンパク質を有するものが特に好ましい。

【0059】

かかる改変アデノウイルスベクターは、当該技術分野で周知の分子生物学的手法、例えば、ウイルスゲノムの両端に共有結合した末端タンパク質を保持したままの、ゲノム末

端タンパク質複合体（以下DNA-TPCと略す）を用いる方法（Yoshidaら、Hum. Gene Ther. 9:2503-1515（1998）等を参照）などによって作製することができる。かかる手法はいずれも当業者に良く知られたものである。典型的には、まず、pAxCw、pAxC Awt等のコスミドカセットに目的とする遺伝子を組み込んだコスミドを作製する一方、ウイルスからDNA-TPCを調製し、適当な制限酵素で切断しておく。次に、前述のコスミドおよび制限酵素処理したDNA-TPCを適切な宿主細胞、例えば293細胞にコトランスフェクションする。その後、適当な条件で一定期間培養し、培養液中にウイルス粒子として放出された組換えアデノウイルス粒子を回収することができる。

【0060】

本発明に用いられる間葉系細胞には、上記の他、例えば、細胞の増殖や神経細胞への分化を促進する遺伝子、細胞の生存率を高める遺伝子、細胞の寿命を延長する遺伝子（例えばテロメラーゼ遺伝子：国際公開第03/038075号パンフレット参照）、細胞周期を調節する遺伝子、細胞の遊走能を向上させる遺伝子、神経保護作用を有する遺伝子、アポトーシス抑制効果を有する遺伝子など、プリオン病の治療効果を高める効果を有する任意の遺伝子を導入することができる。

なお、間葉系細胞についてなされる上記改変は、他の任意の種類細胞についても適宜行うことができ、こうして作製された改変細胞を、異常プリオンの増殖を阻害するために用いることもできる。かかる改変細胞も本発明に包含されるものとする。

【0061】

本発明のプリオン病治療剤は、プリオン病の治療効果を高める効果を有する種々の物質を添加した剤（組成物）として投与することができる。

かかる物質としては、例えばPrP^S増殖阻害活性を有するものが挙げられる。PrP^S増殖阻害物質の例としては、アンホテリシンB、コンゴレッド、アントラサイクリン、キナクリン、チロロン、クロロキン、E-64dなどのシステインプロテアーゼ阻害剤（上記Doh-Ura K et al.）、プロマジン、クロルプロマジン、アセプロマジンなどのフェノチアジン誘導体（上記Korth C et al.）、ポルフィリンやフタロシアニンなどのテトラピロール類（上記Caughey WS et al.）、ペントサンポリサルフェート、リアクティブ・グリーンおよびリアクティブ・レッドなどのリアクティブ・ダイ、キニーネ、8-ヒドロキシキノリン-2-カルボクサアルデヒド8-キノリルヒドラゾン、2-ピリジンカルボクサアルデヒド2-キノリルヒドラゾンおよび2, 2'-バイキノリンなどのキニーネ類（特開2003-40778号公報）などの化合物、PrP^Cのドミナントネガティブ変異体をコードする遺伝子構築物（非特許文献1）、ならびに、PrP^Cおよび/またはPrP^Sに結合する物質などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0062】

PrP^Cおよび/またはPrP^Sに結合する物質には、抗プリオン抗体またはその断片（例えば、非特許文献2、非特許文献3、特開2003-144148、特開2003-321498、上記Enari M et al.、上記Peretz D et al.、上記Gilch S et al.などを参照）、プロトカドヘリン43およびOB-カドヘリン-1などのカドヘリン（特表2000-51213号公報）、プラスミノゲン、プラスミノゲン断片およびその誘導体（特表2004-501626号公報）などが挙げられるが、このうちPrP^S増殖阻害活性を有するものが好ましい。

【0063】

また、ある物質がPrP^S増殖阻害活性を有するか否かは、特開2003-149237号公報などに記載された周知の方法を用いて決定ことができ、かかる方法によって同定された任意のPrP^S増殖阻害物質（例えば、クロロフィルa、クロロフィルb、銅クロロフィル、銅クロロフィリンナトリウム、鉄クロロフィリンナトリウムなど）を、本発明の剤に用いることができる。

プリオン病の治療効果を高める効果を有する物質としては、上記の他、例えば細胞の増殖や神経細胞への分化を促進する物質、細胞の生存率を高める物質、細胞の寿命を延長する物質、細胞周期を調節する物質、細胞の遊走能を向上させる物質、神経保護作用を有す

る物質、アポトーシス抑制効果を有する物質などが包含される。

【0064】

本発明の治療剤の調製に際しては、前記のようにして作製した間葉系細胞（改変されたものを含む）をそのまま用いることもできるが、細胞を作製し、必要に応じて増殖させた後、これを凍結保存し、用事に解凍して治療剤の調製に用いることもできる。

本発明のプリオン治療剤は、当業者に公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、必要に応じて水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。また、注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなビヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0065】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムなどが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80、HCO-50などと併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルなどの容器に充填する。

【0066】

対象の体内への投与はいずれの経路によってもよいが、好ましくは非経口投与であり、特に好ましくは局所投与または静脈内投与である。投与回数は1回が好ましいが、状況に応じて複数回投与することもできる。また、投与時間は短時間でも長時間持続投与でもよい。本発明の治療剤は、より具体的には、注射によりまたは経皮的に投与することができる。注射による投与の例としては、例えば、静脈内注射、動脈内注射、選択的動脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、脳室内注射、脳内注射、髄液腔内注射などによるものが挙げられるが、好ましくは静脈内注射である。

静脈内注射の場合、通常の輸血の要領での投与が可能となり、対象を手術する必要がなく、さらに局所麻酔も必要ないため、対象および術者双方の負担を軽減することができる。また手術室以外での投与操作が可能である点で有利である。

【0067】

さらに本発明は、対象へ治療上有効量の本発明の治療剤を投与（好ましくは、静脈内投与）することを含む、プリオン病の治療方法に関する。

上記治療方法に用いられる剤に含まれる骨髓細胞、臍帯血細胞、あるいは末梢血細胞等の間葉系細胞は、投与による拒絶反応の危険性を防止するために、免疫抑制などの特殊な操作を行わない限りは、対象自身の体内から採取されたもの、あるいはそれに由来するもの（対象由来の自家細胞）であることが好ましい（自家移植療法）。かかる態様は、免疫抑制剤の併用が回避できる点で好ましい。免疫抑制処置を行えば他家細胞の使用も可能であるが、自家細胞を用いる方が圧倒的に良好な治療効果が期待できる。

【0068】

自家細胞の使用が困難な場合には、他の対象または他の医療用動物由来の細胞を利用することも可能である。細胞は冷凍保存したものであってもよい。

なお前記自家細胞は、対象の体内から未分化の状態で採取されたもの、対象の体内から未分化の状態で採取された間葉系幹細胞に遺伝子操作を加えたもの、または対象の体内か

ら未分化の状態で採取された間葉系幹細胞を分化誘導させたもののいずれであってもよい。

また、本発明の治療方法において、本発明の剤（間葉系細胞、例えば骨髄細胞等を含むもの）の対象への投与は、例えば、上述の方法に従って、好適に実施することができる。また、医師または獣医師においては、上記方法を適宜改変して、本発明の剤を対象へ投与することが可能である。

また、本発明の上記治療方法は必ずしもヒトのみに限定されない。通常、ヒト以外の哺乳動物（例えば、マウス、ラット、スナネズミ、モルモットなどの齧歯類、ネコ、ピューマ、トラなどのネコ科動物、シカ、オオシカなどのシカ科動物、ミンク、ヒツジ、ヤギ、ウシ、サルなど）においても間葉系細胞を用いて、同様に本発明の方法を実施することが可能である。

【0069】

本発明の別の側面では、間葉系細胞の、プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤の製造への使用、および、間葉系細胞を含む、プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤が提供される。ここで、物質とは、間葉系細胞の内部に挿入できるものや、細胞表面に付着できるものであれば特に限定されず、例えば、異常プリオンの増殖を阻害する物質、細胞の増殖や神経細胞への分化を促進する物質、細胞の生存率を高める物質、細胞の寿命を延長する物質、細胞周期を調節する物質、細胞の遊走能を向上させる物質、神経保護作用を有する物質、アポトーシス抑制効果を有する物質などの、プリオン病の治療効果を高める効果を有する物質のほか、色素、酵素、蛍光物質、放射性同位体などの標識物質、周囲の細胞へ任意の遺伝子を導入するためのベクターなどが包含される。かかる物質の中でも、プリオン病の研究、診断、治療などに有用なものが好ましい。

上記送達剤は、すでに記載した本発明の治療剤と同様の方法で作製し、対象に投与することができる。

【実施例】

【0070】

本発明を、以下の実施例を用いてより具体的に説明するが、本発明の範囲は、これらの実施例に限定されるものではない。

実施例1：抗PrPモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

精製したリコンビナントPrP (rPrP) あるいはスクレイビー0biihiro株感染マウス脳から精製した異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})を抗原として、プリオンタンパク質ノックアウトマウス(Prnp^{-/-}マウス)を免疫し、得られた脾臓細胞とミエローマ細胞株(P3U1)とを融合させてハイブリドーマを得、これをPrPとの結合性についてスクリーニングした(Kim et al. 2004. Virology 320: 40-51参照)。

【0071】

(1) 抗原の調製

大腸菌発現ベクターpRSETB (Invitrogen社製)を用いて、大腸菌にマウスPrPの23～231位に相当する組換えポリペプチド(rPrP)を発現させた。rPrPは封入体中に発現されるので、これを8Mの塩酸グアニジンで可溶化し、Ni²⁺-IMACで精製した。精製物を分子内にSS結合を有するものについて逆相HPLCでさらに精製したrPrPを抗原とした(上記Kim et al. 参照)。

【0072】

(2) マウスの免疫

対象動物として10～12週齢のPrnp^{-/-}マウス(Yokoyama et al. 2001. J Biol Chem 276: 11265-11271)を用いた。マウスに上記抗原200μgをフロイント完全アジュバントとともに皮下接種した。その後2週間ごとに、上記抗原100μgをフロイント不完全アジュバントとともに皮下接種した。最終免疫は上記抗原50μgを尾静脈より注射することにより行った。

【0073】

(3) 細胞融合およびハイブリドーマの選択

最初の免疫から42日目に、深麻酔下の免疫マウスより脾臓を摘出し、単細胞懸濁液を調製した。得られた細胞をポリエチレングリコール1500を用いてP3U1細胞と融合させた。得られたハイブリドーマの培養上清をrPrPおよび精製PrP^Scを抗原としたELISAによりスクリーニングした。rPrPあるいは精製PrP^Scと反応する抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングした。

【0074】

実施例2: 抗PrPモノクローナル抗体のPrP^Sc増殖阻害活性

実施例1で得られた抗体のうち、PrP^Sc増殖阻害活性を有するものを選択した。プリオン持続感染細胞I3/I5 (Race et al. 1987 J Gen Virol 68: 1391-9) を0.1~10 μ g/mlの濃度の抗PrPモノクローナル抗体を含む培地で3日間培養した。培地を除去後に、細胞をPBSで洗浄し、0.5% Triton-X100、0.5%デオキシコル酸ナトリウムを含む緩衝液で溶解し、20 μ g/mlのプロテインキナーゼKで37℃にて20分消化した。プロテインキナーゼKの活性を2mMのPefablockを加えて停止した後、100,000 \times g、2時間の遠心によりPrP^Scを回収した。PrP^Scはウェスタンブロット法により検出した。

【0075】

以下の実施例では、このうちPrP^Sc増殖阻害活性を示さなかった43C5 (IgG1)、ならびに、PrP^Sc増殖阻害活性を示した72-5 (IgG1、寄託番号: FERM P-18516) および44B1 (IgG2a、寄託番号: FERM P-18515) の3種のハイブリドーマを用いた。

【0076】

実施例3: 抗プリオン抗体遺伝子の同定

(1) 抗体遺伝子のクローニング

実施例2で選択したハイブリドーマから定法に従い全RNAを調製し、5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法およびRT-PCR法にて抗体遺伝子(重鎖、軽鎖)をそれぞれクローニングした。5'-RACE法はSMART (登録商標) RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)を用いて行った。抗体遺伝子クローニングのために以下に示すプライマーを作製した。図1に抗体遺伝子とプライマーとの対応関係を示す。

【0077】

【表 1】

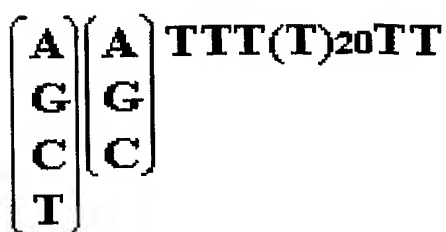
抗P r P抗体遺伝子のクローニングに用いたプライマー一覧

- 1936 (配列番号 9) : 35mer 5'- TCACTCGAGGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGCA -3'
- 1937 (配列番号 10) : 32mer 5'- ACCCTCGAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTG -3'
- 1938 (配列番号 11) : 36mer 5'- CGCGGATCCCTTAACACTCATTCTGTGTTGAAGCTCTT -3'
- 1940 (配列番号 12) : 23mer 5'- CTTGACCAGGCATCCCAGGGTCA -3'
- 1941 (配列番号 13) : 25mer 5'- CCTGGATCTGCTGCCCAAATAACT -3'
- 1942 (配列番号 14) : 25mer 5'- CGGAAAGTGCTGTTGAACTGCTCCT -3'
- 1943 (配列番号 15) : 24mer 5'- AGGTGCACACAGCTCAGACGCAAC -3'
- 1944 (配列番号 16) : 33mer 5'- CCGAGATCTCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAGG -3'
- 1980 (配列番号 17) : 26mer 5'- CGGAGATTTTGCATATTGCAGCAGT -3'
- 1982 (配列番号 18) : 28mer 5'- AATAGTCTACAAAATCTTCAGACTCAAG -3'
- 1999 (配列番号 19) : 23mer 5'- CAGTCTCACTTGTCGGGCAAGTC -3'
- 2000 (配列番号 20) : 26mer 5'- ATCTAAACTGGATGTGGCGTAGATCA -3'
- 2001 (配列番号 21) : 23mer 5'- GAGCCAGTGACCTTGACCTGGAA -3'
- 2002 (配列番号 22) : 23mer 5'- CACATTGCAGGTGATGGACTGGC -3'
- 2003 (配列番号 23) : 25mer 5'- AGTACACAGCTCAGACACAAACC -3'
- 2004 (配列番号 24) : 23mer 5'- CTCATCCAGTCCTGGTGCTGGAT -3'
- 2006 (配列番号 25) : 24mer 5'- CCGAGATCTCATTTACCCGGAGTC -3'
- 2007 (配列番号 26) : 26mer 5'- ATTGTCATTGCAGTCAGGACTCAGCA -3'
- 2009 (配列番号 27) : 24mer 5'- ACTCAGCATGGACATGAGGGCTCC -3'

【0078】

RACE用cDNAは、次のようにして調製した。すなわち、43C5、72-5、44B1それぞれの全RNA 1 μ gに、5'-CDSプライマー1 μ l、SMART II A (登録商標) オリゴヌクレオチド (配列番号7) 1 μ l、脱イオン水を加え5 μ lとし、70℃で2分間加温し、氷中で2分間急冷した。次に5 \times First-Strandバッファー2 μ l、DTT (20 mM) 1 μ l、dNTPミックス (10 mM) 1 μ l、PowerScript (登録商標) 逆転写酵素1 μ lを加え全量を10 μ lとし、42℃で90分インキュベートした。次に72℃で7分間加熱し、5'-RACE用cDNAとした。5'-CDSプライマーは、下表2のものを用了。

【表 2】



【0079】

抗体の変換領域の5'-RACEは、下記の組成のマスターミックス(表4)およびRACE反応液(表5)を用い、クローンテック社のマニュアルにしたがって作製した。ユニバーサルプライマーとしては、以下の組み合わせからなる混合物(UPM: Universal Primer A Mix)を用いた。

【表3】

Long (0.4 mM): 5' - CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT - 3' (配列番号8)

Short (2 mM): 5' - CTAATACGACTCACTATAGGGC - 3'

【0080】

5'-RACE用プライマー(GSP: Gene Specific Primer、遺伝子特異的プライマー)としては、1940(43C5、72-5重鎖)、2002(44B1重鎖)1936(43C5、44B1軽鎖)を用いた。反応は、94℃5秒、72℃3分を5サイクル; 94℃5秒、70℃10秒、72℃3分を5サイクル; 68℃10秒、72℃3分を25サイクルの条件で行った。

【0081】

【表4】

マスターミックスの組成

PCR グレードの水	30.5 μ l
10×Advantage-HF 2 PCR バッファー	5 μ l
10×Advantage-HF 2 dNTP ミックス	5 μ l
50×Advantage-HF 2 ポリメラーゼミックス	1 μ l
合計	41.5 μ l

【0082】

【表5】

5'-RACE 反応液の組成(単位: μ l)

	5'-RACE	GAPDH (陽性対照)	UPMのみ (陰性対照)	GSPのみ (陰性対象)
5'-RACE 用 cDNA	2.5	2.5	2.5	2.5
UPM (10×)	5.0	5.0	5.0	
GSP (10 μ M)	1.0			1.0
対照用 5'-RACE GAPDH プライマー(10 μ M)		1.0		
H ₂ O			1.0	5.0
マスターミックス	41.5	41.5	41.5	41.5
最終体積	50.0	50.0	50.0	50.0

【0083】

RT-PCRは定法に従って行った。即ち、2 μ lのcDNA、1 μ lの10 μ Mプライマー、4.5 μ lのH₂Oにマスターミックスを加えて50 μ lとした反応液を94℃3分; 94℃3秒、65℃3分を30サイクル; 65℃3分の条件で反応させた。cDNAは上記の5'-RACE用に調製したものをを用いた。RT-PCR用プライマーとしては、1941、1942、1943、1944(43C5、72-5重鎖定常領域)、2001、2003、2004、2006(44B1重鎖定常領域)、1937、1938(43C5、72-5、44B1軽鎖定常領域)および1980、1982、1999、2000、2007、2009(72-5軽鎖可変領域)を用いた。

【0084】

上記のようにして得られた各抗体遺伝子の可変領域および定常領域の増幅産物 (cDNA) を、2%アガロースゲルによる電気泳動によりそれぞれ確認し、予想される分子量のバンドを切り出し、ガラスビーズ法にて精製し、TOPO-TAクローニングベクタープラスミドにサブクローニングした。なお、44B1重鎖可変領域はトランスポゾンを含むシュード遺伝子を排除するために、トランスポゾン領域に特異的なXbaIで5'-RACE産物を消化し、分子量が変わらなかった約700bp (44B1VH-700)、800bp (44B1VH-800) の2本のバンドをアガロースゲルより切り出し、サブクローニングを行った。

【0085】

(2) 配列決定

上記で得られたプラスミドを、ミニプレップにより、BigDye (登録商標) Terminator cycle Sequencing kitのマニュアルに従って精製した。すなわち、400ngのプラスミドDNAに、4μlのBigDye (登録商標)、2μlの5×シーケンス用バッファー、3.2μlのシーケンス用プライマー (1pM/μl) および適量の脱イオン水を加え20μlとし、サーマルサイクラー (Perkin-Elmer GeneAmp (登録商標) System 2400) にてPCR反応を行った (35サイクル: 96℃10秒、55℃5秒、60℃4分)。次にPerforma DTRゲル濾過カートリッジで脱塩を行い、スピードバックで溶媒を除去、20μlのHi-Diホルムアミドを加え、95℃で5分間加熱後、氷水中で2分間急冷しシーケンスサンプルを得た。配列決定はABI PRISM 3100を用いて行った。

【0086】

この結果、43C5重鎖 (43C5H: 配列番号1)、43C5軽鎖 (43C5L: 配列番号2)、72-5重鎖 (72-5H: 配列番号3)、72-5軽鎖 (72-5L: 配列番号4)、44B1重鎖 (44B1H: 配列番号5)、44B1軽鎖 (44B1L: 配列番号6) の6種の配列を得た。表6に各配列におけるシグナルペプチド領域、可変領域および定常領域を塩基番号で示す。

【表6】

抗プリオン抗体遺伝子の構成

	シグナルペプチド領域	可変領域	定常領域
43C5H	116-172	173-527	528-1501
43C5L	111-167	168-505	506-827
72-5H	74-130	131-476	477-1450
72-5L	38-94	95-426	427-748
44B1H	149-205	206-559	560-1552
44B1L	90-149	150-397	398-806

【0087】

実施例4: 抗プリオン抗体遺伝子の発現

(1) 発現ベクターへのクローニング

43C5、72-5のIgG1重鎖は、定常領域をEcoRI/XmaIサイトおよびXmaI/BglIIサイトの2パートで切り出しを行った。次に、発現ベクタープラスミドpCAccをEcoRI/BglIIで消化し、これに定常領域 (CH1-2) EcoRI/XmaIおよび定常領域 (CH2-3) XmaI/BglIIを3パートライゲーションで挿入し、pCAcc/CHを作製した。続いて、これをEcoRI/BstEIIで消化し、EcoRI/BstEIIサイトで切り出した可変領域のcDNAをEcoRI/BstEIIサイトでライゲーションさせ、発現プラスミドpCAcc/43C5H、pCAcc/72-5Hを作製した。

【0088】

43C5、44B1のκ軽鎖は、可変領域をEcoRI/XhoIサイトで切り出し、定常領域はXhoI/BamHIサイトで切り出しを行った。これらのインサートcDN

AをpCAcc/EcoRI/BglIIに3パーツライゲーションで挿入し、発現プラスミドpCAcc/43C5L、pCAcc/44B1Lを作製した。

72-5 κ 軽鎖は、上記で作製したpCAcc/43C5LをEcoRI/XhoIで消化し、これにEcoRI/XhoIサイトで切り出した可変領域を挿入して発現プラスミドpCAcc/72-5Lを作製した。

44B1IgG_{2a} 重鎖は、可変領域をEcoRI/PstIサイト、定常領域をPstI/BglIIサイトで切り出し、pCAcc/EcoRI/BglIIに3パーツライゲーションで挿入し、発現プラスミドpCAcc/44B1Hを作製した（図2参照）。

【0089】

(2) 抗体の産生

6穴プレートに、293T細胞を 5×10^5 細胞/ウェルで12時間培養した。上記のようにして得られた発現プラスミドをミニプレップで精製し、それぞれの抗体に対応する重鎖と軽鎖についての発現プラスミドをそれぞれ2.5 μ g用意し、lipofectAMINE（登録商標）2000のプロトコルに従いリポフェクション法で293T細胞にコトランスフェクションした。48時間培養後、293T細胞を回収し、可溶化後、還元条件でSDS-PAGEを行った。泳動したゲルをニトロセルロース膜に転写し、西洋ワサビ標識抗マウスIgG抗体を用いて、抗体の発現を確認した。図3に示すように還元条件下で分子量175~180kDaの抗体タンパクが検出された。

【0090】

別な実験では、トランスフェクト293T細胞により分泌された抗体をサンドイッチELISA法により定量した。上記と同様に各抗体の発現プラスミドで293T細胞をトランスフェクトし、48時間培養後、その上清を採取した。プレートに結合させる固相化抗体として抗マウスIgG抗体を用いた。所定の濃度になるように0.1Mの炭酸バッファ（pH 8.5）にて濃度調整した固相化抗体を50 μ lずつ各ウェルに添加し、37℃で1時間インキュベートし、プレート表面に結合させた。次いで、プレート表面の非抗原結合部位をマスクするために、ヤギ血清（ブロッキング剤）を150 μ l/ウェル添加し、37℃で1時間ブロッキング操作を行った。ブロッキング操作後、0.02% Tween（登録商標）-PBSにて5分×3回、各ウェルを洗浄し、過剰のブロッキング剤を除いた。

【0091】

ブロッキング後のプレートに、前記培養上清および検量線用のマウスIgGを所定の濃度になるように希釈、調製し、各ウェルに50 μ l添加した。37℃で1時間反応を行い、0.02% Tween（登録商標）-PBSにて5分×3回、各ウェルを洗浄した。次いで、二次抗体として西洋ワサビ標識抗マウスIgG抗体を所定の濃度になるようにヤギ血清で希釈し、添加した。37℃で1時間反応後、ウェルを洗浄し、発色基質（TMB）を各ウェルに100 μ l添加し、37℃で15分放置後、反応停止液である1N H₂SO₄を50 μ l/ウェルで添加し、450nmにて測定した。その結果、44B-1、72-5および43C-5の抗体遺伝子でトランスフェクトされた細胞の培養上清中に発現抗体が分泌されていることが示された（表7参照）。

【0092】

【表7】

トランスフェクト細胞により分泌された抗PrP抗体の定量

クローン名	44B1	72-5	43C-5
抗体濃度 (μ g/ml)	230	260	10

【0093】

(3) 組換え抗体の反応性

トランスフェクト細胞により分泌された抗体のプリオンタンパク質への反応性をサンド

イッチELISA法により検討した。図4に示すように、組換え抗体がプリオンタンパク質と反応することが確認された。

【0094】

実施例5:抗プリオン抗体遺伝子含有アデノウイルスの作製

(1) 抗プリオン抗体遺伝子含有コスミドの構築

インサートcDNAは実施例4で得たpCAcc/IgH (pCAcc/43C5H、72-5Hおよび44B1H)、およびpCAcc/L (pCAcc/43C5L、72-5Lおよび44B1L) からClaIサイトで抗体遺伝子cDNAを切り出し、グラスミルク法で精製した。コスミドベクターは、RGDファイバー改変型アデノウイルスを発現するpWEAx-F/RGD/ClaI/CIApを使用した(Nakamura T et al. 2002. Hum Gene Ther 13(5):613-26)。ベクター1 μ gにインサートcDNAを1:1~10のmol比で加え、ライゲーション反応を行った。次にGigapack III Gold Packagingキット (Invitrogen社製) を使用し、上記各cDNAを含む6種のコスミド (pWEAx-43C5HL-F/RGD、pWEAx-43C5LL-F/RGD、pWEAx-72-5HL-F/RGD、pWEAx-72-5LL-F/RGD、pWEAx-44B1HL-F/RGD、pWEAx-44B1LL-F/RGD) を作製した(図5参照)。コスミドは制限酵素によるDNAチェック後、500mlスケールで培養を行いNucleoBond BAC100で精製した。

【0095】

(2) 抗プリオン抗体遺伝子含有アデノウイルスの作製

各抗プリオン抗体の重鎖遺伝子または軽鎖遺伝子を含むアデノウイルスは、コスミド単独法またはCOS-TPC法により作製した。

1) コスミド単独法

実施例5(1)で得た組換えコスミドDNA 20 μ gをPacIで消化した。消化物を、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿の後、20 μ lの滅菌蒸留水に溶解した。こうして得たPacI消化済みコスミド5 μ gを10cmのシャーレで培養した293T細胞にリポフェクション法でトランスフェクションした。37℃、5%CO₂で一晩培養し、EDTA-PBS(-)を用いて細胞を回収した。回収した細胞懸濁液の原液、3倍希釈液、5倍希釈液のそれぞれをコラーゲンコート96ウェルプレートに播いた。

2) COS-TPC法

組換えコスミドDNA 5 μ gとアデノウイルスゲノムDNA-TPC 1 μ gをリン酸カルシウム法で293T細胞にトランスフェクトした。37℃、5%CO₂で一晩培養し、EDTA-PBS(-)を用いて細胞を回収した。回収した細胞懸濁液の原液、3倍希釈液、5倍希釈液のそれぞれをコラーゲンコート96ウェルプレートに播いた。

【0096】

3) アデノウイルスの精製

5日後と10日後に、上記で調製した各ウェルに50 μ lの10%FBS-DMEMを加えた。7日目以降、ウイルスが増殖し細胞が変性したウェルをチェックした。数日後すべての細胞が変性したウェルについて、培養液ごと細胞を回収した。回収した細胞は超音波破碎後遠心し、その上清を1次ウイルス液とした。

コラーゲンコート24ウェルプレートにそれぞれ70~100%コンフルエントまで培養した293T細胞を準備した。1次ウイルス液の各サンプルを10 μ l/ウェルの割合で、2ウェル分の293T細胞感染させた。数日後すべての細胞が変性したウェルについて、培養液ごと細胞を回収した。回収した細胞液の一部は超音波破碎後遠心し、上清を2次ウイルス液とした。残りの細胞液は遠心後培地を捨て、cell packとし、全DNAを抽出後、制限酵素で消化し、組換えアデノウイルスDNAの構造を確認した。

【0097】

2次ウイルス液については、10cmシャーレに293T細胞(90%コンフルエント)を準備し、30 μ lの2次ウイルス液を加え感染させた。3~4日後すべての細胞が変性したことを確認し、培養液ごと細胞を回収した。回収した細胞液の一部はcell p

ackとし、全DNAを抽出後、制限酵素で消化し組換えアデノウイルスDNAの構造を確認した。残りの細胞液は超音波破碎後遠心し上清を3次ウイルス液とし、 -80°C で保存した。3次ウイルス液については、その後、10cmシャーレに293T細胞(90%コンフルエント)を30枚準備し、 $30\mu\text{l}$ の3次ウイルス液を加え感染させた。3~4日後すべての細胞が変性したことを確認し、培養液ごと細胞を回収した。超音波破碎後、CsClステップ勾配法でウイルス精製を行った。精製したウイルスは制限酵素を用いたDNAチェック、PCRによる野生型アデノウイルスの混入がないことを確認し精製ウイルスとして -80°C で保存した。

こうして、上記各cDNAを含む6種のアデノウイルスベクター(Ax43C5H、Ax43C5L、Ax72-5H、Ax72-5L、Ax44B1HおよびAx44B1L)を得た。

【0098】

実施例6：間葉系幹細胞(MSC)の調製

(1) マウスMSCの調製

マウス(ICRまたはC57BL/6系統、6週齢、雌)の大腿骨を深麻酔下に摘出し、PBS(ー)中で余剰の筋組織を除去した後、大腿骨頭および膝関節直上部を切断し、2mlの培地(2%FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン、L-グルタミン加IMDM)で、骨髓細胞を10cmディッシュ中に洗い出した。得られた骨髓細胞を、 $70\mu\text{m}$ メッシュを介して50mlチューブ(ファルコン社製)に集め、PBSで洗浄後(1000rpm、10分)、培養用培地(20%熱不活化CSまたはFBS、 $50\mu\text{M}$ 2-ME、ペニシリン/ストレプトマイシン、L-グルタミン加IMDM)中に再懸濁し、6ウェルプレートに播種した(大腿骨1本/ウェル)。細胞を 33°C 、5% CO_2 で24時間培養後、浮遊細胞を除去し、付着細胞をさらに培養に供した。これ以降は、3~4日ごとに培地交換を行った。継代はトリプシン/EDTAを1ml加え室温で5分間静置後、容易に剥離する細胞を回収し継代した。

【0099】

次に、上記付着細胞のうちCD45(ー)細胞を以下のようにして選択した。まず、培養14(~21)日目の細胞を採取し、2%FCS加IMDMで3回洗浄後、 1×10^7 細胞/mlの濃度で、2%FCS加IMDMに再懸濁した。得られた細胞懸濁液(1ml)に $10\mu\text{l}$ のCD45マイクロビーズ液を加え、室温で20分間インキュベートした。その後、AutoMACS(登録商標)(Miltenyi Biotec社製)を用いた磁気細胞分離法により、CD45(ー)細胞を分離した。得られた細胞が、CD11b(ー)、CD45(ー)の間葉系幹細胞(MSC)であることを、FACS分析(図6)および形態学的観察(図7)により確認した。図7より、CD45(+)細胞のコロニーが比較的広がりのある大型の細胞と、小型の細胞とが入り混じったものであるのに対し、CD45(ー)細胞のコロニーが、間葉系幹細胞の特徴である、広がりのある大型の細胞のみの単一細胞集団となっていることが分かる。

【0100】

(2) ヒトMSCの調製

ヒトMSCはKobune M et al. 2003. Experimental Hematology 31:1-8の記載に従って調製した。即ち、健康なヒトボランティアの後腸骨稜から骨髓単核細胞を採取し、 150cm^2 の組織培養用プラスチックフラスコにて一晚インキュベートした。その後、浮遊細胞を洗浄除去し、付着細胞を培養用培地(10%熱不活化ウシ胎児血清加DMEM)中、 37°C 、5% CO_2 、湿潤環境下で培養した。

【0101】

実施例7：抗プリオン抗体遺伝子のMSCへの導入

(1) アデノウイルスベクターによる導入

24穴プレートにICRマウス由来のMSC(ICR/MSC)を 5×10^4 細胞/ウェルの濃度で播種し、そこに実施例5で得たAx43C5HおよびAx43C5L、またはAx44B1HおよびAx44B1Lをそれぞれ1500pu/細胞の濃度で加え、共

感染させた。48時間培養後、培養上清中の抗体の存在をウェスタンブロット法で評価した。43C5についての結果を図8に示す。また、培養上清中の抗体量は、実施例4と同様にサンドイッチELISA法により定量した。結果を下表8に示す。

【0102】

(2) エレクトロポレーションによる導入

ICRマウスまたはヒトMSCを 2×10^5 細胞/ $100 \mu\text{l}$ の濃度で含む細胞懸濁液に、発現プラスミドpCAcc/72-5HおよびpCAcc/72-5L、あるいはpCAcc/44B1HおよびpCAcc/44B1Lを、各プラスミドあたり $2.5 \mu\text{g}$ 加え、ヒトMSCnucleofectorキット (Amaxa Biosystems社製) を用い、製造者のプロトコルに従って、U-23 high transfection efficiency条件下でエレクトロポレーションを行った。得られた細胞を6ウェルプレートに播種し、48時間培養後、培養上清の一部を採取し、IsoStrip (ロッシュダイアグノスティックス社製) にて抗体の発現を確認した (図9)。その後さらに48時間培養後、培養上清中の抗体量を、実施例4と同様にサンドイッチELISA法により定量した。結果を下表8に示す。

【0103】

【表8】

抗プリオン抗体遺伝子導入MSCによる抗プリオン抗体の分泌

(単位: $\mu\text{g}/10^5$ 細胞/48時間)

	アデノウイルス	エレクトロポレーション	
	ICR/MSC	ICR/MSC	ヒト MSC
43C5	4		
72-5		0.63	2.8
44B1	0.15	0.28	2.8

【0104】

実施例8: プリオン病の病変部位に物質を送達するための剤の作製

(1) 間葉系細胞へのLacZ遺伝子の導入

実施例6(1)で調製したICR/MSCを、24穴プレートに 5×10^3 細胞/ウェルの濃度で播き、 33°C で12時間、 $5\% \text{CO}_2$ 下で培養した。LacZ遺伝子を発現するアデノウイルスベクターAxCAZ3-F/RGDを、0、1000、3000、10000 pu/細胞の濃度で、 37°C にて1時間感染させ、48時間後にX-gal染色を行った。その結果、3000 pu/細胞以上の濃度で、すべての細胞にLacZ遺伝子が導入されることが確認された (図10)。

【0105】

(2) 間葉系細胞へのDsRed遺伝子の導入

DsRed遺伝子の導入にはNucleofector (amaxa biosystems社製) のHuman MSC nucleofector kitを用いた。即ち、実施例6(1)で調製したICR/MSCまたは実施例6

(2)で調製したヒトMSC 2×10^5 個を $100 \mu\text{l}$ のトランスフェクションバッファに懸濁し、DsRed遺伝子を含む $2 \mu\text{g}$ のpCAcc/DsRed発現ベクターを加え、エレクトロポレーション (プログラム: U-23 high transfection efficiency) を行った。得られた細胞を6ウェルプレートに細胞を播き、48時間培養後、FACSにて遺伝子導入効率を検討した。その結果、ヒトMSCで15.84%、ICR/MSCで5.78%と良好な遺伝子導入効率を得られることが確認できた (図11)。

上記(1)および(2)で得られたMSCは、いずれもプリオン病の病変部位に遊走するので、当該部位にLacZ遺伝子やDsRed遺伝子などの所望の遺伝子およびその遺伝子産物を送達することができる。

【図面の簡単な説明】

【0106】

【図1】 抗体遺伝子とプライマーとの位置関係を示した模式図である。

【図2】抗体遺伝子の発現ベクターへのクローニング手順を示した模式図である。

【図3】抗体遺伝子をトランスフェクトした293T細胞による抗体の発現をウェスタンブロット法により評価した結果を示した図である。

【図4】抗体遺伝子をトランスフェクトした293T細胞により産生された抗体の、プリオンタンパク質への結合能を表したグラフである。

【図5】抗体遺伝子を含むコスミドの模式図である。

【図6】CD45(+)細胞およびCD45(-)細胞について行ったFACS分析の結果を示す図である。

【0107】

【図7】CD45(+)細胞およびCD45(-)細胞の形態学的な違いを示した写真図である。

【図8】43C5抗体の遺伝子を含むアデノウイルスベクターAx43C5HおよびAx43C5Lを同時感染させたICRマウスのMSCによる抗体遺伝子の発現をウェスタンブロット法により評価した結果を示した図である。レーン1はコントロール、レーン2は抗体遺伝子導入細胞である。

【図9】72-5抗体の遺伝子を含む発現ベクター(pCAcc/72-5HおよびpCAcc/72-5L)、または44B1抗体の遺伝子を含む発現ベクター(pCAcc/44B1HおよびpCAcc/44B1L)を導入したヒトおよびマウスMSCにより産生された抗体のアイソタイプを示す写真図である。

【図10】LacZ遺伝子を導入したICR/MSCをX-gal染色した結果を示した写真図である。

【図11】DsRed遺伝子を導入したヒトMSCまたはICR/MSCについて行ったFACS分析の結果を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RenoMedix Inst. Inc.

<120> Agent for treating prion disease and production method thereof

<130> 2185RM

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1509

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-PrP mAb H chain

<400> 1

gaattcgccc ttctaatacg actcactata gggcaagcag tggtatcaac gcagagtacg	60
cgggaacata tgtccaatgt cctctccaca ggcaactgaac aactgactc taaccatggg	120
atggagctgg atctttctcc tcttcctgtc aggaactgca ggtgtcctct ctgaggtcca	180
gctgcaacag tctggacctg aggtgggtgaa gcctggggct tcattgaaga taccctgcaa	240
ggcttctgga tacacattca ctgactacaa catggactgg gtgaagcaga gccatggaaa	300
gagccttgag tggattggag atattaatcc taacaatggg ggtactatct acaaccacaa	360
cttcacggac aaggccacat tgactgtaga caagtcctcc agcacagcct acatggagct	420
ccgcagcctg acatctgagg aactgcagt ctattactgt gcaagggcta cttcgttagt	480
agactttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctcagcca aaacgacacc	540
cccatctgtc tatccactgg cccctggatc tgctgccccaa actaactcca tggtgaccct	600
gggatgcctg gtcaagggtc atttcctga gccagtgaac gtgacctgga actctggatc	660
cctgtccagc ggtgtgcaca cttcccagc tgtcctgcag tctgacctct aactctgag	720
cagctcagtg actgtcccct ccagcacctg gccagccag accgtcacct gcaacgttgc	780
ccacccggcc agcagcacca aggtggacaa gaaaattgtg ccagggatt gtggttgtaa	840

gccttgcata tgtacagtcc cagaagtatc atctgtcttc atcttcccc caaagcccaa 900
 ggatgtgctc accattactc tgactcctaa ggtcacgtgt gttgtggttag acatcagcaa 960
 ggatgatccc gaggtccagt tcagctggtt tgtagatgat gtggaggtgc acacagctca 1020
 gacgcaaccc cgggaggagc agatcaacag cactttccgt tcagtcagtg aacttcccat 1080
 catgcaccag gactggctca atggcaagga gttcaaatgc agggtaaca gtgcagcttt 1140
 ccctgcccc atcgagaaaa ccattcctaa aaccaaaggc agaccgaagg ctccacaggt 1200
 gtacaccatt ccacctcca aggagcagat ggccaaggat aaagtcagtc tgacctgcat 1260
 gataacaaac ttcttcctg aagacattac tgtggagtgg cagtggaatg ggcagccagc 1320
 ggagaactac aagaacactc agcccatcat ggacacagat ggctcttact tcgtctacag 1380
 caagctcaat gtgcagaaga gcaactggga ggcaggaaat actttcacct gctctgtgtt 1440
 acatgagggc ctgcacaacc accatactga gaagagcctc tcccactctc ctggtaaagt 1500
 agatctcgg 1509

<210> 2

<211> 836

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-PrP mAb L chain

<400> 2

gaattcgccc ttctaatacg actcactata gggcaagcag tggatatcaac gcagagtacg 60
 cggggactga tcagtctcct caggctgtct cctcaggttg cctcctcaaa atgaagttgc 120
 ctgttaggct gttggctgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtgat gttttgatga 180
 cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc tcttgcagat 240
 ctagtcagag cattgtacat actaatggaa acacctatct agaatggttc ctgcagaaac 300
 caggccagtc tccaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct ggggtcccag 360
 acaggttcag tggcagtgga tcaggacagc atttcacact caagatcagc agagtggagg 420
 ctgaggatct gggagtttat tactgctttc aaggttcact tgttccgtac acgttcggag 480

gggggaccaa gctggaaata aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc atcttccac 540
cctcgagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg aacaacttct 600
accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa aatggcgtcc 660
tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc agcaccctca 720
cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc actcacaaga 780
catcaacttc acccatgttc aagagcttca acaggaatga gtgttaagga tccgcg 836

<210> 3

<211> 1458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-PrP mAb H chain

<400> 3

gaattcgccc ttctaatacg actcactata gggcaagcag tggatatcaac gcagagtacg 60
cgggactcta accatggaat ggatctggat ctttctcttc atcctgtcag gaactgcagg 120
tgtccaatcc caggttcagc tgctgcagtc tggagctgaa ctggcgaggc ctggggcttc 180
agtgaagctg tcctgcaagg gttctggcta caccttcaca agctatagta taagttgggt 240
gaagcagaga actggacagg gccttgagtg gattggagag atttatccta gaagtggtaa 300
tacttactac aatgagaagt tcaaggacaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag 360
cacagcgtac atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc 420
aacggattac ctgtttgctt actggggcca agggacgctg gtcactgtct ctgcagccaa 480
aacgacaccc ccatctgtct atccactggc ccctggatct gctgccc aaa ctaactccat 540
ggtgaccctg ggatgcctgg tcaagggcta tttccctgag ccagtgcag tgacctggaa 600
ctctggatcc ctgtccagcg gtgtgcacac ctcccagct gtcctgcagt ctgacctta 660
cactctgagc agctcagtga ctgtcccctc cagcacctgg ccagccaga ccgtcacctg 720
caacgttgcc caccggcca gcagaccaa ggtggacaag aaaattgtgc ccagggattg 780
tggttgtaag ccttgcatat gtacagtccc agaagtatca tctgtcttca tcttcccc 840

aaagcccaag gatgtgtca ccattactct gactcctaag gtcacgtgtg ttgtggtaga 900
catcagcaag gatgatcccg aggtccagtt cagctggttt gtagatgatg tggagggtgca 960
cacagctcag acgcaacccc gggaggagca gatcaacagc actttccgtt cagtcagtga 1020
acttcccatc atgcaccagg actggctcaa tggcaaggag ttcaaagtca ggggtcaacag 1080
tgcagctttc cctgccccca tcgagaaaac catctccaaa accaaaggca gaccgaaggc 1140
tccacaggtg tacaccattc cacctcccaa ggagcagatg gccaaaggata aagtcagtct 1200
gacctgcatg ataacaaact tcttccctga agacattact gtggagtggc agtggaatgg 1260
gcagccagcg gagaactaca agaacactca gcccatcatg gacacagatg gctcttactt 1320
cgtctacagc aagctcaatg tgcagaagag caactgggag gcaggaaata ctttcacctg 1380
ctctgtgtta catgagggcc tgcacaacca ccatactgag aagagcctct cccactctcc 1440
tggtaaatga gatctcgg 1458

<210> 4

<211> 757

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-PrP mAb L chain

<400> 4

gaattcgccc ttattgtcat tgcagtcagg actcagcatg gacatgaggc ctcctgcaca 60
gatttttggc ttcttgttgc tcttgtttcc aggtaccaga tgtgacatcc agatgaccca 120
gtctccatcc tccttatctg cctctctggg agaaagagtc agtctcactt gtcgggcaag 180
tcaggacatt ggtagtagtt taaactggct tcaacaggaa ccagatggaa ctattaaacg 240
cctgatctac gccacatcca gtttagattc tgggtgtcccc aaaaggttca gtggcagtag 300
gtctgggtca gattattctc tcaccatcag cagccttgag tctgaagatt ttgtagacta 360
ttactgtctg caatatgcaa aatctccgta cacgttcgga ggggggacca agctggaaat 420
aaaacgggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca ccctcgagtg agcagttaac 480
atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc taccctaaag acatcaatgt 540

caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgtc ctgaacagtt ggactgatca 600
ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcaccctc acgttgacca aggacgagta 660
tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag acatcaactt cacccattgt 720
caagagcttc aacaggaatg agtgttaagg atccgcg 757

<210> 5
<211> 1560
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-PrP mAb H chain

<400> 5
gaattcgccc ttctaatacg actcactata gggcaagcag tggtatcaac gcagagtacg 60
cggggagctc tgacagagga ggccagtcct ggaattgatt cctagttcct cacgttcagt 120
gatgagtatt gatcacagac ccctcacat gaacttcggg ctcagattga ttttccttgt 180
cctcacttta aaagggtgtcc agtgtgacgt gaagctgggtg gagtctgggg aaggcttagt 240
gaagcctgga gggtcctga aactctcctg tgcagcctct ggaatcactt tcagtaggta 300
tgccatgtct tgggttcgcc agactccaga gaagaggctg gagtgggtcg catacattag 360
tagtggtggt gattacatca actatgcaga cactgtgaag ggccgattca ccatctccag 420
agacaatgcc aggaacaccc tgtacctgca aatgagcagt ctgaagtctg aggacacagc 480
catgtattac tgtacaagag taactccata ttggtacttc gatgtctggg gcacagggac 540
cacggtcacc gtctcctcag caaaacaac agcccatcg gtctatccac tggcccctgt 600
gtgtggaggt acaactggct cctcgggtgac tctaggatgc ctggtcaagg gttatttccc 660
tgagccagtg accttgacct ggaactctgg atccctgtcc agtgggtgtgc acaccttccc 720
agctctcctg cagtctgacc tctacacct cagcagctca gtgactgtaa cctcgagcac 780
ctggcccagc cagtccatca cctgcaatgt ggcccacccg gcaagcagca ccaagggtgga 840
caagaaaatt gagcccagag ggcccacaat caagccctgt cctccatgca aatgcccagc 900
acctaacctc ttgggtggac catccgtctt catcttcctt ccaaagatca aggatgtact 960

catgatctcc ctgagcccca tagtcacatg tgtggtggtg gatgtgagcg aggatgaccc 1020
agatgtccag atcagctggt ttgtgaacaa cgtggaagta cacacagctc agacacaaac 1080
ccatagagag gattacaaca gtactctccg ggtggtcagt gccctcccca tccagcacca 1140
ggactggatg agtggcaagg agttcaaagtg caaggtaaac aacaaagacc tcccagcgcc 1200
catcgagaga accatctcaa aacccaaagg gtcagtaaga gctccacagg tatatgtctt 1260
gccctccacca gaagaagaga tgactaagaa acaggctact ctgacctgca tggtcacaga 1320
cttcatgcct gaagacatit acgtggagtg gaccaacaac gggaaaacag agctaaacta 1380
caagaacact gaaccagtcc tggactctga tggttcttac ttcattgtaca gcaagctgag 1440
agtggaaaag aagaactggg tggaaagaaa tagctactcc tgttcagtgg tccacgaggg 1500
tctgcacaat caccacacga ctaagagctt ctcccggact ccgggtaaat gagatctcgg 1560

<210> 6
<211> 815
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-PrP mAb L chain

<400> 6
gaattcgccc ttaagcagtg gtatcaacgc agagtacgcg gggagctgcc aggagcctaa 60
taaagcatcc tctcttccag ctctcagaga tggagacaga cacactcctg ctatgggtgc 120
tgctgctctg ggttccaggt tccacaggtg acattgtgct gaccaatct ccagcttctt 180
tgggtgtgtc tctagggcag agggccacca tatcctgcag agccagtga agtgttgata 240
gttatggcaa tagttttatg cactgggtacc agcagaaacc aggacagcca cccaaagtcc 300
tcatttatcg tgcattcaat cgagaatctg ggatccctgc caggttcagt ggcagtgggt 360
ctaggacaga cttcacctc accattaatc ctgtggaggc tgatgatgtt gcaacctatt 420
actgtcagca aagtaatgag gatccgtata cattcggagg ggggaccaag ctggaaataa 480
aacgggctga tgctgcacca actgtatcca tcttcccacc ctcgagtgag cagttaacat 540
ctggaggtgc ctcatctgtg tgcttcttga acaacttcta ccccaaagac atcaatgtca 600

agtgaagat tgatggcagt gaacgacaaa atggcgtcct gaacagttgg actgatcagg 660
acagcaaaga cagcacctac agcatgagca gcaccctcac gttgaccaag gacgagtatg 720
aacgacataa cagctatacc tgtgaggcca ctcaaacagac atcaacttca cccattgtca 780
agagcttcaa caggaatgag tgттаaggat ccgcg 815

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Adapter sequence

<400> 7
aagcagtggg atcaacgcag agtacgcggg 30

<210> 8
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Universal primer

<400> 8
ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45

<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5' RACE primer

<400> 9
tcactcgagg gtgggaagat ggatacagtt ggtgca 36

<210> 10
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

accctcgagt gagcagttaa catctggagg tg

32

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

cgcggtacct taacactcat tcctgttgaa gctctt

36

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' RACE primer

<400> 12

cttgaccagg catcccaggg tca

23

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

cctggatctg ctgcccacaaac taact

25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 14
cggaaagtgc tgttgaactg ctcct

25

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 15
aggtgcacac agctcagacg caac

24

<210> 16
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 16
ccgagatctc atttaccagg agagtgggag agg

33

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 17
cggagatttt gcatattgca gcagt

25

<210> 18
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 18

aatagtctac aaaatcttca gactcaag

28

<210> 19
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 19
cagtctcact tgcgggcaa gtc

23

<210> 20
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 20
atctaaactg gatgtggcgt agatca

26

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 21
gagccagtga ccttgacctg gaa

23

<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5' RACE primer

<400> 22
cacattgcag gtgatggact ggc

23

<210> 23
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 23
agtacacagc tcagacacaa acc 23

<210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 24
ctcatccagt cctggtgctg gat 23

<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 25
ccgagatctc atttaccgag agtc 24

<210> 26
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 26
attgtcattg cagtcaggac tcagca 26

<210> 27

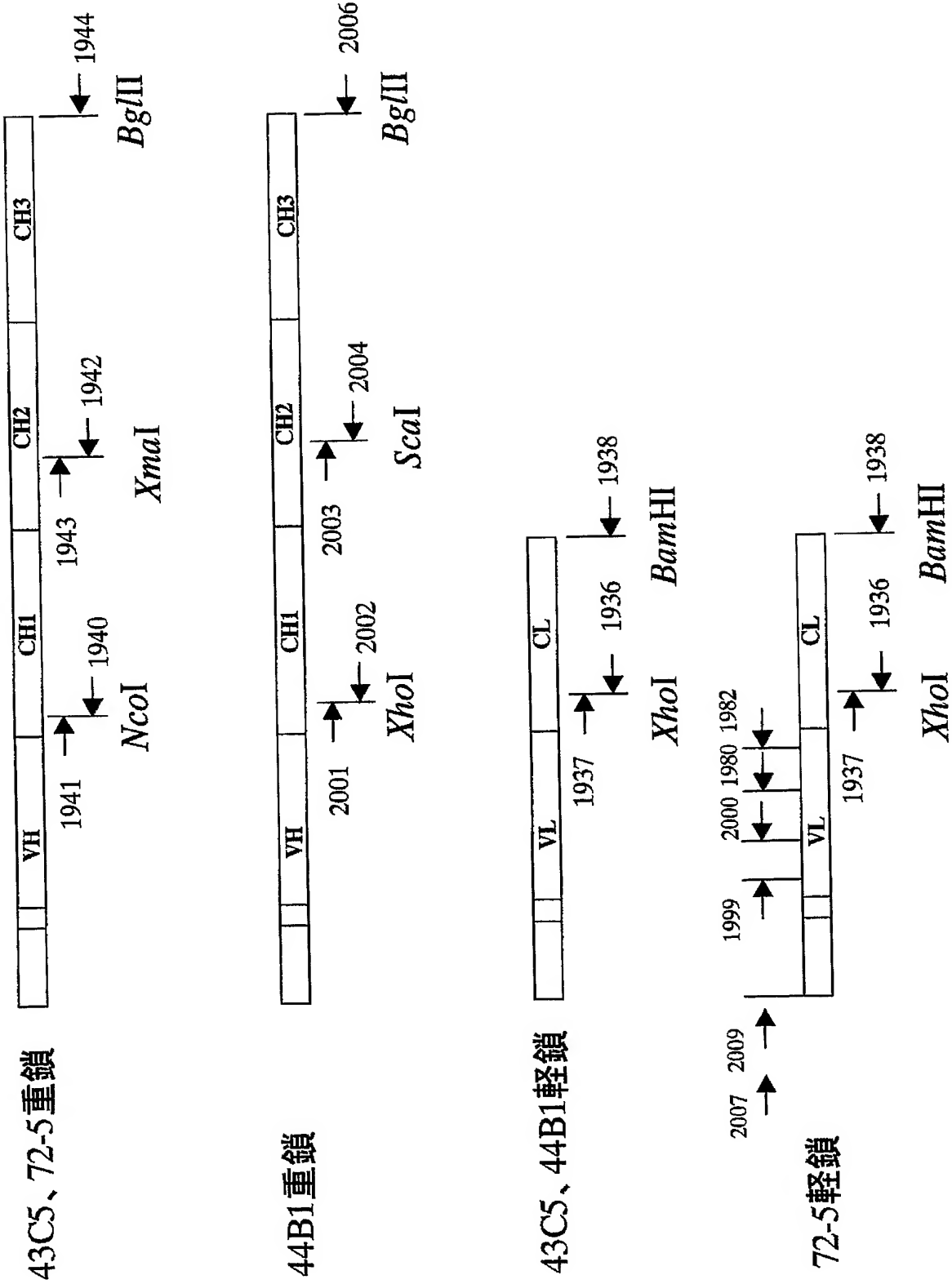
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 27
actcagcatg gacatgaggg ctcc

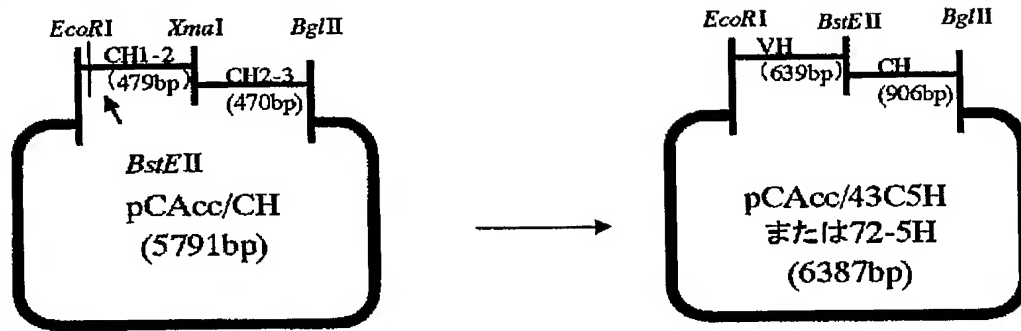
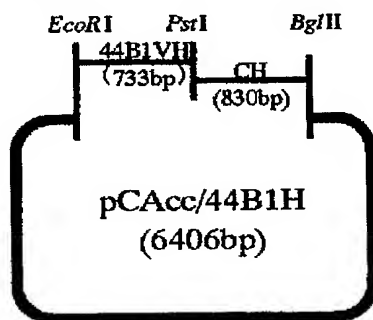
24

【書類名】 図面
【図 1】

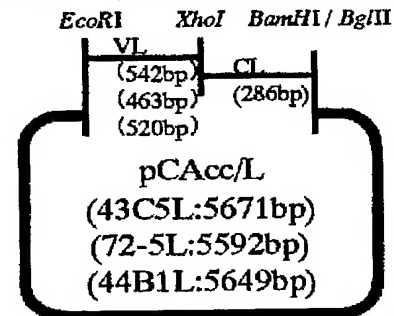


【図 2】

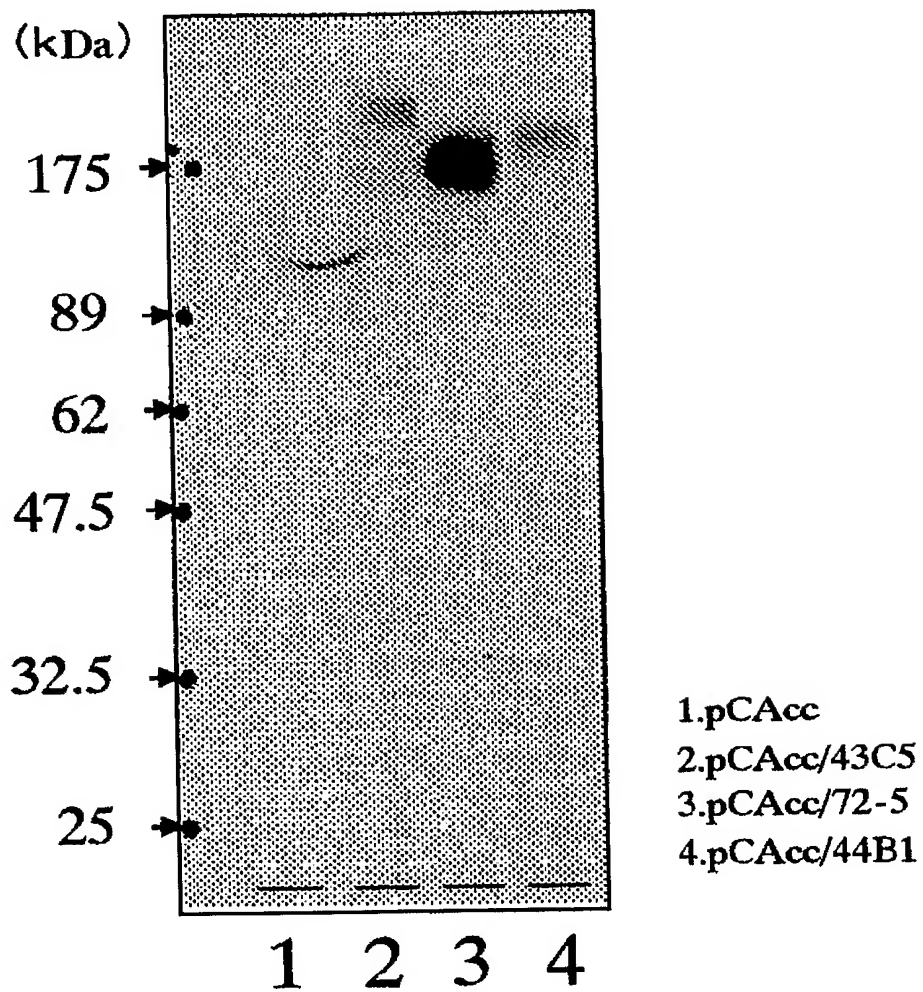
IgG1 重鎖(43C5、72-5)

IgG_{2a} 重鎖(44B1)

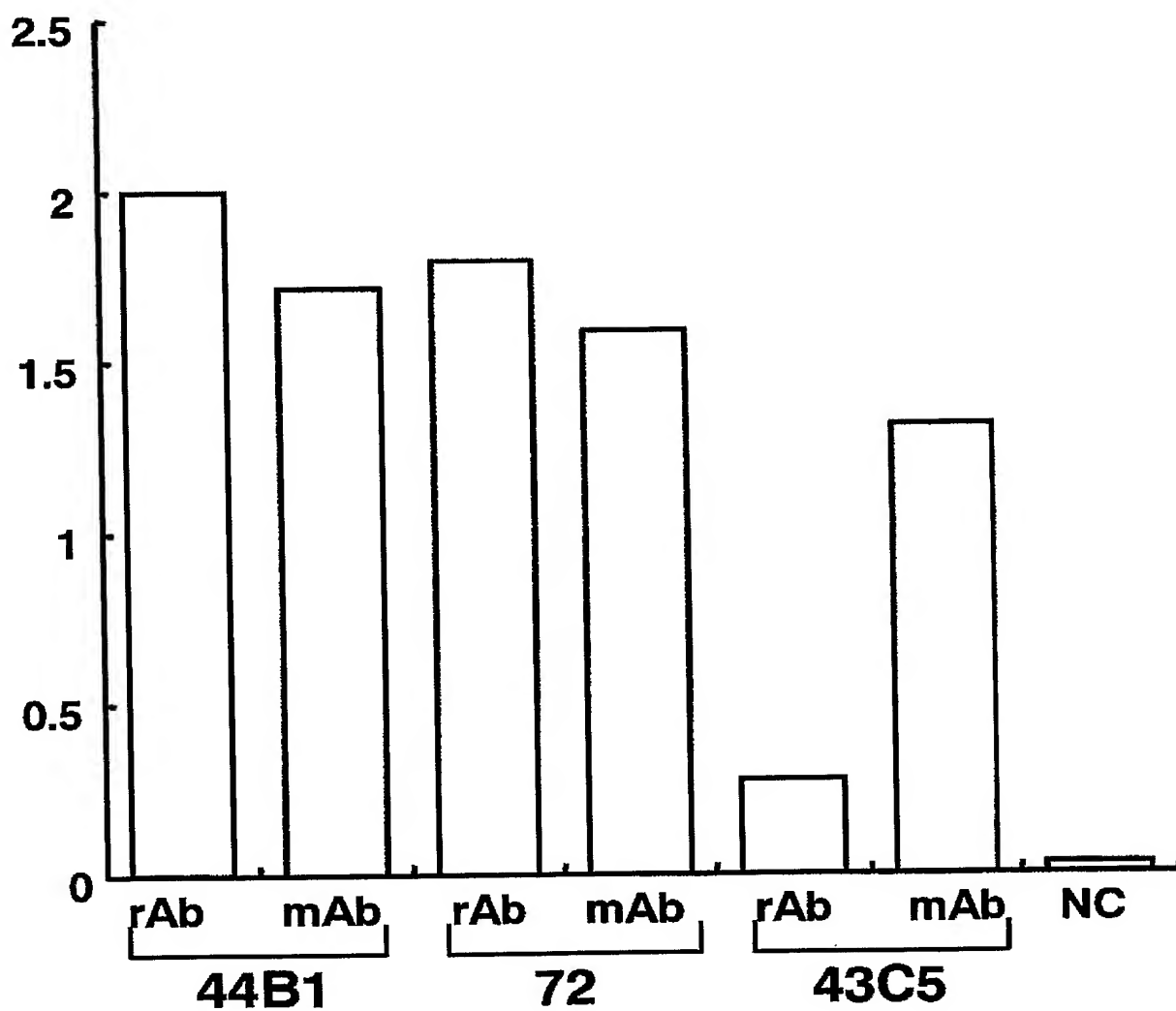
κ軽鎖(43C5、72-5、44B1)



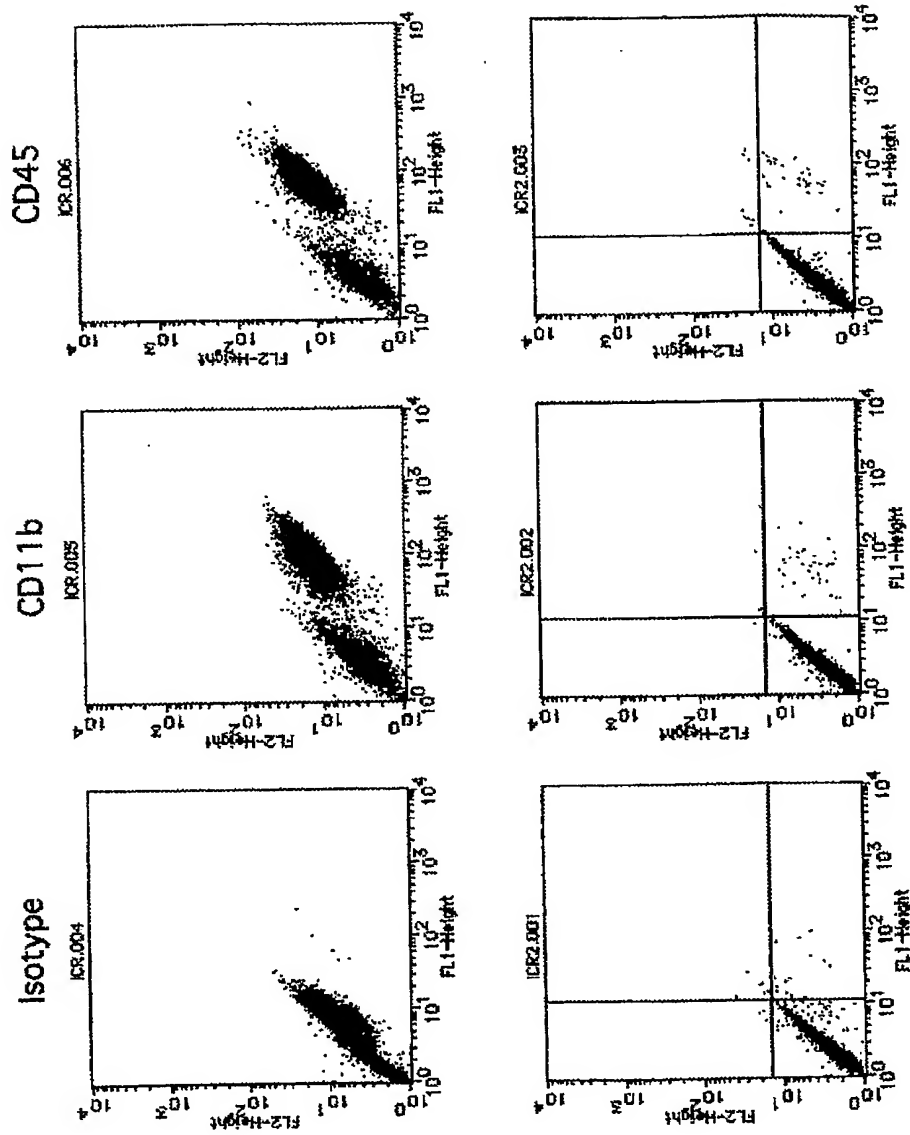
【図 3】



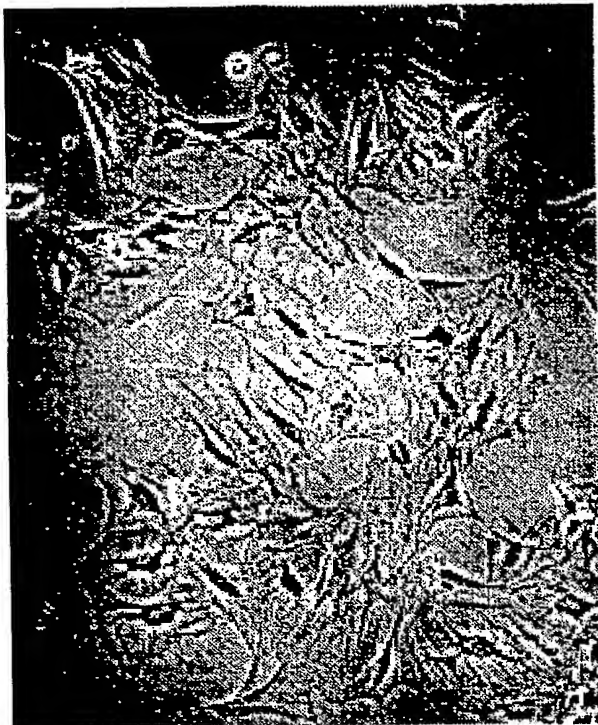
【図 4】



【図6】



【図 7】

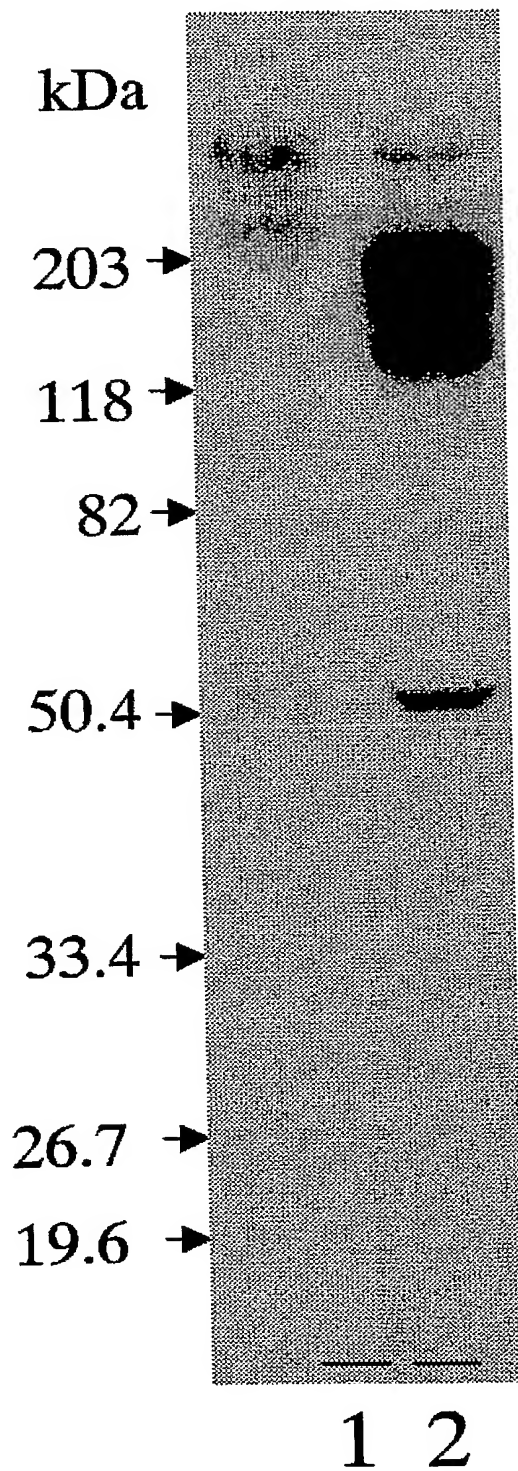


CD45(-)細胞

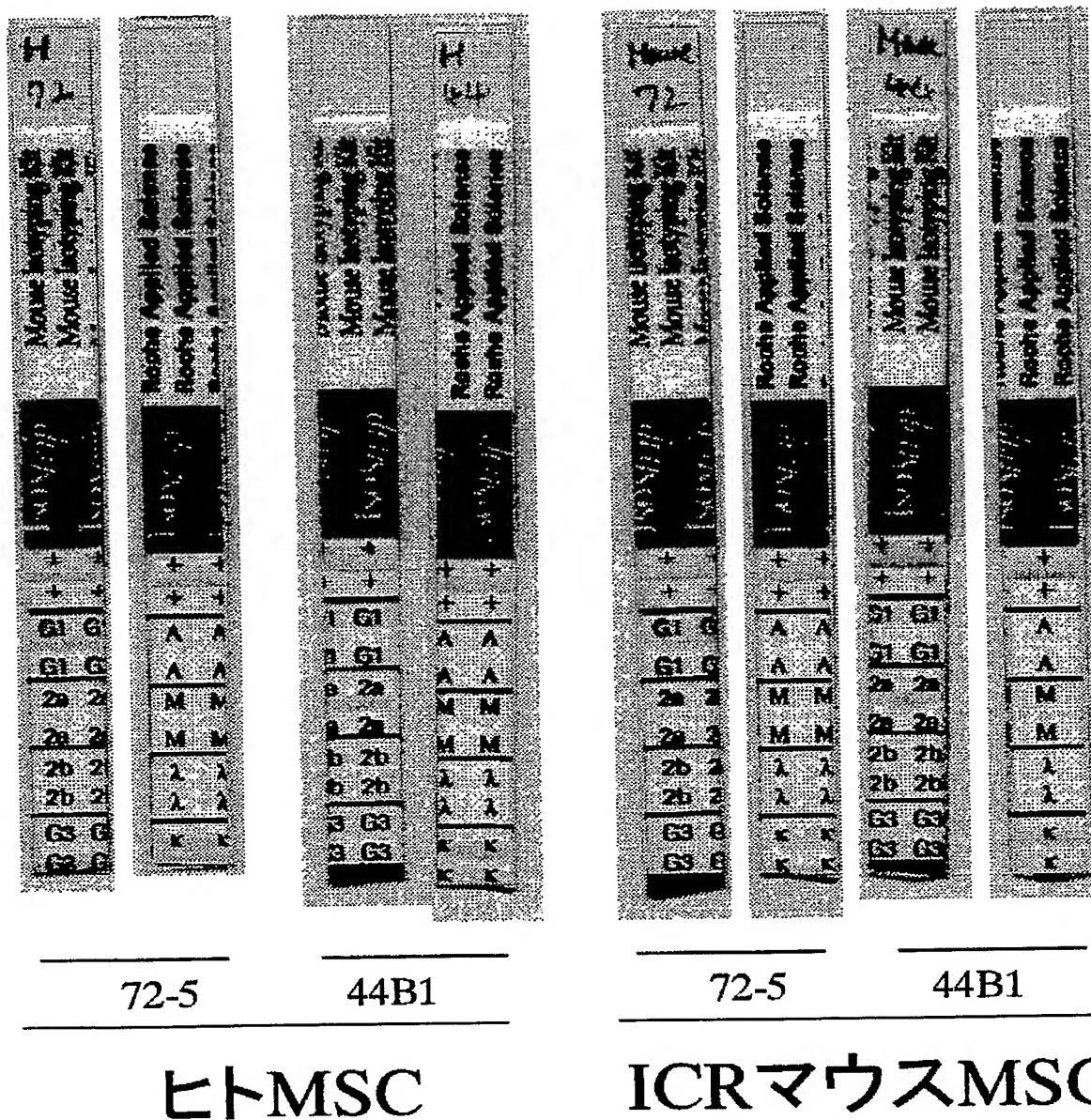


CD45(+)細胞

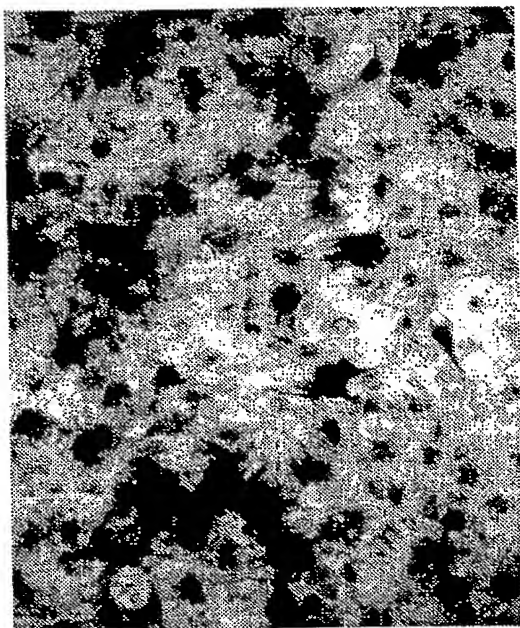
【図 8】



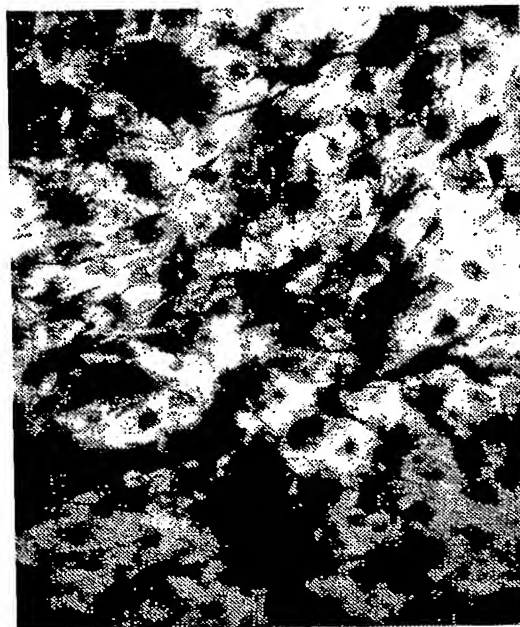
【図 9】



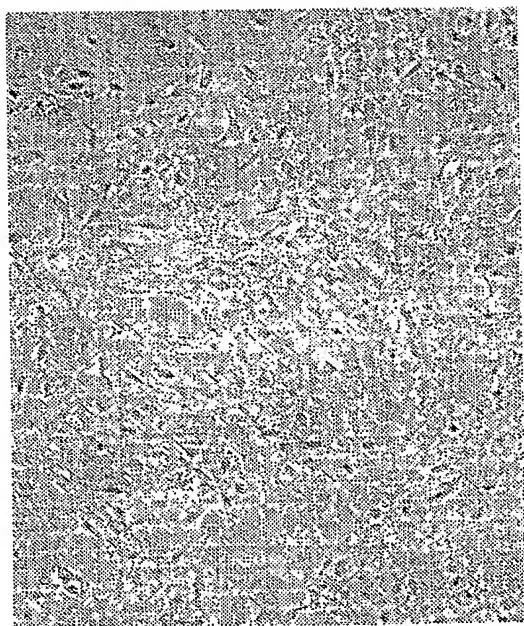
【図 10】



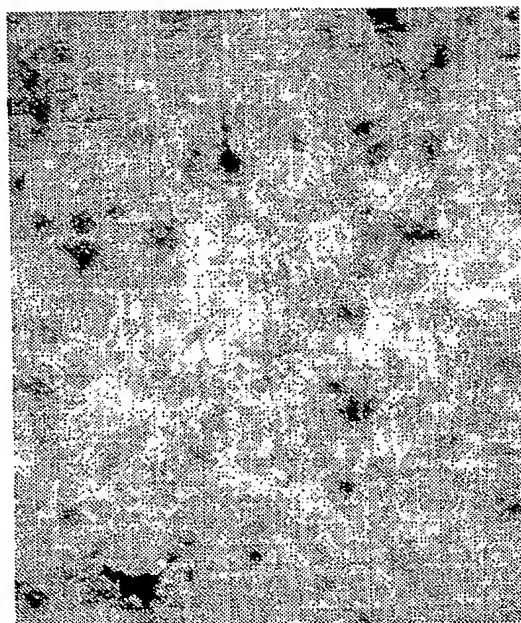
3000



10000



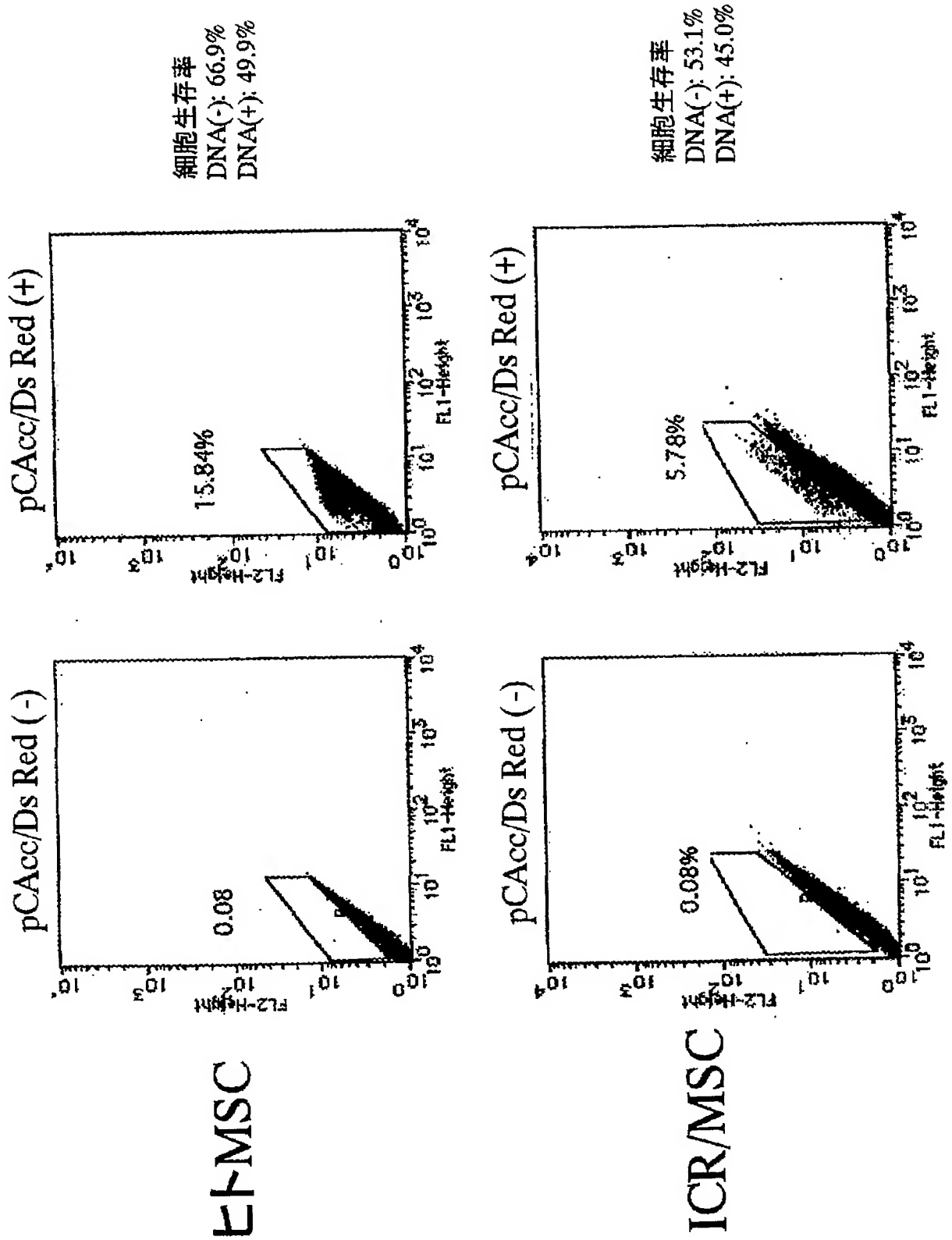
0



1000

pu / 細胞

【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プリオン病の治療に有効で、かつ安全性の高い剤を提供する。

【解決手段】 本発明は、間葉系細胞を有効成分として含むプリオン病治療剤およびその製造方法に関する。本発明はまた、異常プリオン増殖阻害活性を付与された間葉系細胞、特に、抗プリオン抗体遺伝子が導入された間葉系細胞を有効成分として含むプリオン病治療剤およびその製造方法に関する。本発明の治療剤は、プリオン病の進行を止めるだけでなく、当該疾患によって喪失した神経機能を回復させることができる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 1 0 0 6 4 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 2 4 5 5 3 9 3]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 5 月 2 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

北海道札幌市中央区北 1 条東 1 丁目 4 番地 1

氏 名

株式会社レノメディクス研究所

2. 変更年月日

2 0 0 4 年 6 月 3 日

[変更理由]

住所変更

住 所

北海道石狩市新港西 1 丁目 7 7 7 番地 1 2

氏 名

株式会社レノメディクス研究所